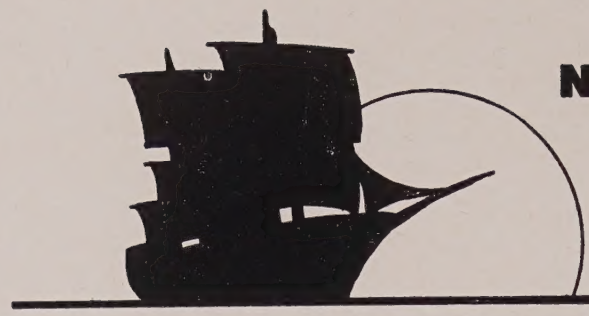
C.S.A 121

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Inst. Med. trop. São Paulo, vol. 2, n.° 1, p. 1-60 ★ Janeiro / Fevereiro, 1960



Novos horizontes na terapêutica da amebíase...

DIANTIL

(CLORBETAMIDA)

Intensa ação amebicida[1]

Não altera a flora intestinal[2]

Tolerância integral[3]

1. McHardy, Brown e McHardy-Journ. Louisiana Med. Soc., 108:52, fev. 1956.
2. Dennis & Berberian - Antibiotics & Chemotherapy, 12:554, maio 1954.
3. Lucena, Durval e Marques, R. J. - Rev. Bras. Med. XII. nov. 1955.

Comprimidos com 0,5 g de substância ativa. Caixas de 24 comprimidos.

Amostras à disposição dos Senhores Médicos

DIANTIL MARCA REGISTRADA é um produto **WINTHROP**

The Sydney Ross Co. - Av. Rio Branco, 251-11.º - Rio de Janeiro - Brasil

Galeria de Tropicalistas Brasileiros

EMÍLIO RIBAS

Emílio Marcondes Ribas foi um dos pioneiros na organização dos serviços de saúde pública do Estado de São Paulo, tendo-se destacado pelos êxitos alcançados na luta contra várias endemias.

Nasceu em Pindamonhangaba (São Paulo), a 11 de abril de 1862 e cursou no Rio de Janeiro a Faculdade de Medicina. Diplomando-se em 1888, começou por exercer a clínica no interior do País para ingressar, alguns anos depois, no quadro de sanitaristas do Estado de São Paulo, onde serviu durante vinte anos.

Seus primeiros trabalhos referem-se ao combate à febre amarela em Campinas, onde ocorriam mais de 300 óbitos no ano de 1897. Investido na chefia do Serviço Sanitário do Estado, já manifestava suas dúvidas quanto à possibilidade de transmissão direta da febre amarela e, assim, 3 meses depois de publicado o relatório da Comissão de médicos norte-americanos, comprovando as observações de Finley, repetiu em São Paulo as mesmas experiências, participando êle próprio, Adolfo Lutz e outros abnegados, das experiências de transmissão por mosquitos.

Dêsse modo, a campanha anti-estegômica tomou rápido impulso, atingindo seus objetivos em 1903, antes que fôsse conseguida a erradicação da moléstia no Rio de Janeiro ou em Cuba.

Para combater a peste que grassava em Santos, cuidou de instalar um laboratório de preparo de sôro antipestoso: o Instituto Butantã, cujo primeiro diretor foi Vital Brasil.

Além do contrôlo da febre amarela e da peste, conseguiu reduzir a zero a mortalidade pela varíola, tendo estudado cuidadosamente a forma paravariólica ou alastrim. O Hospital de Isolamento e numerosos outros serviços de saúde, como os de Engenharia Sanitária, Higiene Escolar, Assistência à Infância, Profilaxia do Tracoma, etc., foram por êle criados ou reorganizados.

Nos últimos anos de sua vida dedicou-se a estudar o problema da lepra, empenhando-se em humanizar a situação dos hansenianos. Lutando contra os preconceitos dominantes na época, conseguiu que os leprosários fôssem instalados no continente, com os enfermos perto das vistas de seus familiares e dos centros de pesquisa e não isolados em ilhas, como se pretendia.

Faleceu em São Paulo, a 19 de dezembro de 1925.

L. Rey

Gallery of Brazilian Tropicalists

EMÍLIO RIBAS

Emílio Marcondes Ribas was one of the pioneers in the organization of public health services in the State of São Paulo, Brazil, and became notorious through his successful campaigns against several endemic diseases.

Born in Pindamonhangaba, São Paulo, on April 11, 1862, he graduated from the Rio de Janeiro Faculty of Medicine in 1888, and soon afterwards started practicing in the interior of his native State. Some years later he became a State Public Health Officer, a career to which he devoted himself for the next twenty years.

His first activities were concerned with the fight against yellow fever in and around the town of Campinas, where more than 300 people died of the disease in 1897. As head of the São Paulo Public Health Service he expressed his doubts as to the possibility of direct transmission or yellow fever, and no later than three months after the report of Reed's Yellow Fever Commission confirmed Finlay's observations, Ribas repeated the American experiments and, together with Adolfo Lutz, acted as volunteer in mosquito transmission tests.

The anti-*aegypti* campaign he undertook resulted in the elimination of yellow fever from his area in 1903, even before the disease was erradicated from Rio de Janeiro or Cuba.

To fight plague in Santos he built a laboratory devoted to the preparation of anti-plague serum, the now famous Instituto Butantã.

Besides controlling yellow fever and plague, he reduced to zero small-pox mortality and carefully studied a closely related disease, *alastrim*.

The Quarantine Hospital and numerous branches of the public health services in São Paulo, such as Sanitary Engineering, School Health Services, Child Welfare, Trachoma control, etc., were either created or reorganized by him.

The last years of his life were devoted to the problem of leprosy. Fighting against the prejudices prevailing at the time, he tried to humanize the situation of the victims of Hansen's disease, by bringing the leper colonies — then isolated on islands — to the mainland, where the sick could remain closer to their relatives and to the research centers.

He died in São Paulo, on December 19, 1925.

L. Rey

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/revista-do-instituto-de-medicina-tropical-de-sao-paulo_january-february-1960_2_1

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(1):5-7, janeiro-fevereiro 1960

ASSOCIAÇÃO DE ESTREPTOMICINA E DE DIAMINO-DIFENIL-SULFONA (DDS) NO TRATAMENTO DA LEPRA MURINA

Antônio Carlos MAURI [1]

RESUMO

A administração de diamino-difenil-sulfona e estreptomicina a ratos inoculados com o bacilo de Stefansky determinou involução mais nítida e mais rápida das lesões, do que a obtida com o uso isolado da sulfona.

A avaliação dos resultados foi feita pelo exame macroscópico, caráter histológico das lesões e pela sobrevida média do grupo de animais tratados pela associação, comparativamente a um grupo contrôle.

Os resultados obtidos permitiram concluir por uma potenciação da ação quimioterápica da associação diamino-difenil-sulfona e estreptomicina no tratamento da lepra murina experimental.

INTRODUÇÃO

SMITH, JACKSON & BAUER [7] demonstraram que a diamino-difenil-sulfona é capaz de potenciar a ação da estreptomicina no tratamento da tuberculose experimental em cobaias. A eficácia quimioterápica da associação foi superior àquela obtida pelas duas substâncias quando empregadas isoladamente, com a vantagem de afastar as possibilidades de reações indesejáveis da estreptomicina, em virtude da redução das doses empregadas.

GRUMBERG & SCHNITZER [1] empregaram estreptomicina no tratamento da lepra murina de camundongos e concluíram que o antibiótico não possui atividade; tais resultados, no entanto, são criticáveis em vista do curto tempo de observação.

LEVADITI & CHAIGNEAU-ERHARD [4], no tratamento da lepra murina de camundongos, puderam demonstrar nítida ação da diamino-difenil-sulfona e da estreptomicina, administradas isoladamente, embora a ação da primeira fôsse superior à do antibiótico.

MAURI, HADLER & CARVALHO [6] demonstraram que o DDS possui nítida ação sôbre a evolução da lepra murina de ratos através da involução histológica das lesões e pelo retardamento do ritmo evolutivo da moléstia.

Estando descritas as ações isoladas da sulfona-mãe e do antibiótico e ainda os bons resultados obtidos pelo emprêgo da associação de ambos no tratamento da tuberculose experimental, no presente trabalho procurou-se determinar o valor da associação estreptomicina + diamino-difenil-sulfona no tratamento da lepra murina experimental de ratos, segundo o método de avaliação descrito por MAURI, HADLER & CARVALHO [5, 6].

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 40 ratos, machos, que apresentavam, no início da experiência, cêrca de 60 a 90 dias de idade, inoculados na mesma data com suspensão de bacilos de

Fac. Medicina Univ. São Paulo — Dep. de Farmacologia (Prof. C. E. Corbett).
(1) Assistente.

Stefansky. A técnica de preparação, concentração bacilar, via de inoculação e dose inoculada, são as preconizadas por HADLER & MAURI [2].

Os animais foram divididos em 2 lotes:

Lote *A* — Constituído por 20 ratos mantidos como contrôle.

Lote *B* — Constituído de 20 ratos, aos quais, 13 dias após a inoculação, iniciou-se a administração diária de 0,020 g de diamino-difenil-sulfona (dose média fornecida em mistura com a dieta) e de 0,030 g de estreptomicina administrada por via subcutânea em duas doses iguais de 0,015 g (pela manhã e à tarde).

Procurou-se fornecer aos animais uma dose individual diária de 0,025 g; a droga e o alimento foram finamente pulverizados e a mistura homogeinizada para evitar-se possibilidade de escolha pelo animal. Conhecendo-se a quantidade da mistura fornecida por dia e as sobras no fim de 24 horas, foi possível a determinação da dose diária de droga ingerida por animal; a dose média geral foi de 0,020 g por dia.

A administração de DDS foi feita durante 296 dias na dose total média de 5,920 g por animal e a estreptomicina apenas durante 141 dias perfazendo a dose total de 4,230 g por animal. A interrupção do uso de estreptomicina foi determinada pela dificuldade de obtenção da droga em estado de pureza e porque, nesta fase do estudo, os animais começaram a apresentar leve queda de pêso que pareceu depender do antibiótico.

Foram feitas anotações periódicas do pêso corpóreo dos animais dos lotes *A* e *B* e autopsiados os que morreram espontâneamente e os que sobreviveram 309 dias após o início da experiência, quando então foram sacrificados.

Foram anotados os achados dos exames macroscópicos e retirados fragmentos de órgãos (fígado, baço e gânglios linfáticos traqueobrônquicos, abdominais e axilares e fragmentos de peritônio) para exames histológicos.

RESULTADOS

A análise dos dados fornecidos pela sobrevida dos animais revelou que todos os ratos do lote *B* (tratados pela associação DDS + estreptomicina) sobreviveram até o fim da experiência (309 dias). O pêso final médio atingido foi de 352 gramas.

Os animais do lote *A* (contrôles) tiveram sobrevida média menor; a partir do 90º dia após a inoculação, morreram 2 animais; aos 120 dias, 4 ratos; aos 180 dias, 6 ratos e assim sucessivamente até que no 240º dia haviam morrido todos os animais dêsse grupo contrôle.

Todos os animais contrôles (lote *A*), que morreram após o 180º dia de inoculação, apresentavam lesões intensas e comprometimento grave do fígado, baço, gânglios linfáticos, traqueobrônquicos, abdominais e axilares, peritônio parietal, visceral, epíplon e medula óssea.

Os aspecto macroscópico e as lesões histológicas assemelhavam-se às descritas por HADLER & MAURI [2, 3], isto é, uma infecção generalizada grave de caráter progressivo, comprometendo intensamente os órgãos descritos.

O aspecto externo dos animais inoculados e não tratados foi precário, isto é, pêlo eriçado, secreção conjuntival, abdome grande, hepatomegalia fàcilmente perceptível pela palpação e edema dos membros posteriores.

Contrastou fortemente com os animais contrôles (lote *A*) a sobrevivência e o aspecto dos animais tratados (lote *B*). Por êsse motivo durante a experiência não foi sacrificado nenhum animal dêste lote e, atingindo o 309º dia após a inoculação, foram sacrificados e necropsiados.

O exame macroscópico das vísceras revelou, em 1 rato, hipertrofia do baço e infiltrados no rebordo inferior do fígado; em 2 outros, lesões infiltrativas no epíplon. Os exames histológicos dêsses infiltrados revelaram tratar-se de lesões nodulares de aspecto involutivo e lesões cicatrizadas. A maioria dessas lesões não continha bacilos ou eram pauci-bacilares e, em algumas, foram encontradas granulações ácido-resistentes.

Os restantes 17 ratos não apresentaram lesões macroscópicas e o exame histológico revelou número reduzido de pequenas lesões no peritônio e gânglios linfáticos e quadro nítido de alterações de caráter involutivo. Notou-se também lesões cicatrizadas, sem bacilos ou raras granulações ácido-resistentes. Resumindo, o aspecto geral dos órgãos dos animais tratados foi, na maioria, normal, sem lesões confluentes, de caráter regressivo, abacilíferas ou pauci-bacilares. O comprometimento visceral foi muito menor do que nos animais contrôles e, histològicamente, êsse aspecto foi ainda mais evidente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Embora não tenha sido obtida a demonstração histológica de cura das lesões da lepra murina e o desaparecimento total dos bacilos, o uso da associação DDS + estreptomicina revelou que num intervalo de tempo de 309 dias foi capaz de determinar um quadro geral de involução da moléstia mais rápido do que aquêle que pode ser obtido com o uso isolado de DDS em doses maiores (cêrca de 500 dias, segundo MAURI, HADLER & CARVALHO [6]), não obstante haver sido interrompido no 141º dia a administração da estreptomicina.

Embora seja desconhecido o modo de ação dessas drogas sôbre o bacilo de Stefansky, o confronto dos resultados obtidos com os animais do grupo contrôle permitiu concluir que a sulfona e estreptomicina, usadas concomitantemente, possuem nítida ação sôbre a infecção, nas condições experimentais descritas. Por outro lado, foi demonstrado em trabalho anterior [6] que resultados comparáveis são obtidos com o uso de DDS isoladamente, nas doses médias de 42,66 mg por dia após 15 a 18 meses de tratamento. Com o emprêgo da associação da sulfona-mãe (dose média de 20 mg por dia durante 296 dias) e estreptomicina (30 mg por dia durante 141 dias) foram obtidos os mesmos resultados em 309 dias, o que permite concluir por uma potenciação da ação quimioterápica de ambos, quando usados concomitantemente no tratamento da lepra murina experimental de ratos, embora interrompida a administração de estreptomicina após 141 dias de uso diário.

SUMMARY

Association of diamino-diphenylsulfone (DDS) and streptomycin in the treatment of murine leprosy.

The concomitant administration of diamino-diphenylsulfone and streptomycin to rats inoculated with the Stefansky bacillus caused more pronounced and more rapid regression of lesions than the isolated use of the sulfone.

The evaluation of the results was accomplished by comparing the macroscopic and histological aspects of the lesions and the average duration of life of animals treated with both drugs and with the sulfone alone. The results obtained justify the conclusion of the existence of a potentiating action between diamino-diphenylsulfone and streptomycin in the treatment of the experimental murine leprosy.

REFERÊNCIAS

1 — GRUMBERG, E. & SCHNITZER, R. J. — Chemotherapy of murine leprosy. Ann. New York Acad. Sci. **54**:107-114, 1951.

2 — HADLER, W. A. & MAURI, A. C. — Lepra murina; estudo patogênico evolutivo no rato inoculado por via peritonial. Rev. brasil. Leprol. **16**:139-163, 1948.

3 — HADLER, W. A. & MAURI, A. C. — Studies of murine leprosy. Int. J. Leprosy **18**:67-178, 1950.

4 — LEVADITI, C.; CHAIGNEAU & ERHARD, H. — Activité anti-microbienne de la Streptomycine, de l'acide p-amino-salicylique et de le diamino-diphenylsulfone chez les souris contaminées par le bacille de Stefansky. Comp. Rend. Soc. Biol. **145**:328-330, 1951.

5 — MAURI, A. C. & HADLER, W. A. — Contribuição ao contrôle experimental das drogas antileprôticas. Memória del V Coongreso Internacional de Lepra, Ed. Cenit, La Habana (Cuba). 1322 pgs., 1949.

6 — MAURI, A. C.; HADLER, W. A. & CARVALHO, C. M. — Quimioterapia da lepra. I. Ação do 4,4'-diamino-difenil-sulfona na lepra murina. Rev. brasil. Leprol. **19**:85-116, 1951.

7 — SMITH, M. I.; JACKSON, E. L. & BAUER, H. — Evaluation of the sulfones and streptomycin in experimental tuberculosis. Ann. New York Acad. Sci. **52**:704-718, 1949.

Recebido para publicação em 8 setembro 1959.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(1):8-16, janeiro-fevereiro 1960

A CLOROFENOXAMIDA COMO POSSÍVEL QUIMIOPROFILÁTICO ANTIAMEBIANO

I. DE CARNERI e G. COPPI

RESUMO

O autor assinala a distribuição do parasitismo pela *E. histolytica* e a incidência da disenteria amebiana no mundo, concluindo pela necessidade de tratamento quimioprofilático nas áreas tropicais e subtropicais de alta endemicidade. Os medicamentos contendo arsênico ou iôdo não podem ser empregados por longo tempo com finalidade quimioprofilática, em virtude de sua possível toxicidade crônica e sua atividade sensibilizante. Por outro lado, os antibióticos exercem influência desfavorável sôbre a flora intestinal normal.

A clorofenoxamida, ao contrário, apresenta numerosas características favoráveis. É ativa *in vitro* contra a *E. histolytica* em doses inferiores a 1 μg/ml, depois de período de contato prolongado por 24-30 horas. Esta atividade foi confirmada nos animais de experiência. Numerosas provas clínicas realizadas em várias partes do mundo mostraram que doses de 1.500 mg por dia, durante 10 ou mais dias, são altamente eficazes no tratamento das várias formas de amebíase intestinal.

Esta atividade é altamente específica; o medicamento se mostra absolutamente inócuo em relação à flora bacteriana normal do intestino. Após tratamentos prolongados, não se notam manifestações tóxicas ou alérgicas nos animais de experiência e no homem. O medicamento é estável no que se refere ao pH gástrico e intestinal e às enzimas gastrentéricas e bacterianas.

As curvas de excreção do medicamento nas fezes de 13 indivíduos foram acompanhadas diàriamente durante 3 semanas, mediante dosagens químicas e microbiológicas. A clorofenoxamida é fracamente absorvida pelo intestino: após cada administração bissemanal de 500 ou de 250 mg, encontram-se nas fezes, por 24 horas ou mais, quantidades largamente excedentes às necessárias para erradicar as amebas. Administrando 250 mg, sòmente 20 mg (8%), constituídos principalmente por seus produtos metabólicos, são excretados com a urina.

Comparando o tempo de ação da clorofenoxamida com a velocidade de sua excreção nas fezes após uma única administração, conclui-se que, na profilaxia, os melhores resultados dever-se-ão obter adotando tratamento contínuo na base de 1 comprimido por dia ou administrando 1 comprimido durante 2 dias consecutivos de cada semana. Entretanto, amplas provas profiláticas levadas recentemente a efeito em zonas hiperendêmicas na Índia, administrando 500 mg de clorofenoxamida, em 2 dias distanciados em cada semana, deram resultados positivos em 100% dos casos.

Inst. Carlo Erba para Pesquisas Terapêuticas, Milão, Itália.

DE CARNERI, I. & COPPI, G. — A clorofenoxamida como possível quimioprofilático antiamebiano. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:8-16, 1960.

INTRODUÇÃO

Freqüência das infecções por "E. histolytica" e da disenteria amebiana no mundo — A distribuição do parasitismo pela *Entamoeba histolytica* no mundo é bem homogênea, interessando nos vários continentes de 10 a 20% da população, para um total de algumas centenas de milhões de pessoas. A distribuição da disenteria amebiana é, ao contrário, muito diferente nas várias latitudes e não coincide, absolutamente, com a disseminação do parasita (de CARNERI [9]). Para dar um exemplo: a freqüência anual com que um portador se transforma em disentérico é de 4:1 na Ásia Central, segundo GNEZDILOV, *apud* HOARE [19], de 150:1 na Armênia, segundo SARKISYAN [25], de 300:1 em São Domingos, segundo WESTPHAL [27], de 1.000.000:1 na Inglaterra, segundo HOARE [18]. Pràticamente, a amebíase clínica só concerne às zonas tropicais e subtropicais (BRUMPT [7]).

Mesmo a freqüência da disenteria amebiana, em relação à da disenteria de origem bacilar, varia de país para país. Segundo os mapas compilados por WESTPHAL [29], colhendo dados diversos publicados entre 1903 e 1953, haveria freqüência de 3% no Brasil (no Rio de Janeiro), de 3,5% em Pôrto Rico, de 8-14% no Egito, de 13% em Java, de 20% na Armênia e na Índia (em Lahore), de 19-24% na Argentina e de 47% nas Filipinas. Algumas das freqüências mais elevadas, devem ser acolhidas com reservas, porquanto baseadas em observações feitas em áreas muito limitadas. Por exemplo: na Somália a *E. histolytica* seria responsável por 45% dos casos de disenteria, no Havaí por 71%, no Congo Belga central por 84%. Estudos mais recentes atribuem à amebíase papel mais modesto; entretanto, êles se limitaram à disseminação das infecções intestinais entre as tropas combatentes, isto é, em ambiente em que notòriamente predominam as disenterias bacilares. Assim, segundo WESTPHAL [30], a *E. histolytica* foi responsável por cêrca de 6% das disenterias verificadas entre as tropas alemãs na África do Norte durante o último conflito. Segundo RADKE [24], no mesmo período houve percentagem global não muito diferente (5%) entre as tropas americanas distribuídas pelas várias frentes. Em certos teatros de operações (Índia, Birmânia), a amebíase foi, todavia, a doença que mais abalou a eficiência das tropas. No exército americano houve, durante a segunda guerra mundial, 27.641 casos comprovados de disenteria amebiana, com um total de 384.209 dias de hospitalização; segundo cálculos mais realistas, os dias de hospitalização teriam sido, ao contrário, de 1.113.000. Devemos ter presente que na disenteria amebiana o período de internação é, em média, 2-3 vêzes mais longo e as recaídas são bem mais freqüentes do que na disenteria bacilar.

A quimioprofilaxia da amebíase — Qualquer que seja o motivo da diferente distribuição mundial do parasita e da doença amebiana, não resta dúvida que um tratamento quimioprofilático no sentido patrocinado por CRAIG [8] e FAUST [13, 14] resulta inútil nas zonas temperadas, mas se impõe nas zonas tropicais e subtropicais, nas quais a disenteria amebiana é freqüente. A importância mesmo econômica da quimioprofilaxia da amebíase nestas últimas zonas consta claramente de uma pesquisa efetuada por HOEKENGA [20] em uma plantação de bananas da United Fruit Co. em Honduras: dentre 209 indivíduos não tratados, durante um período de observação de 12 semanas, houve 12 hospitalizações por colite amebiana e 1 por abscesso hepático amebiano. Pelo contrário, em um grupo de 201 indivíduos submetidos à quimioprofilaxia não houve, no mesmo período, nenhum caso de amebíase clínica.

Segundo FISCHER & REICHENOW [15] "a profilaxia, para ser eficaz, deveria ser realizada com doses terapêuticamente ativas". Êste conceito, segundo nosso ponto de vista, está teòricamente errado. Não é necessário, neste caso, fazer com que o medicamento atinja concentrações ativas, não só na luz intestinal, como também nos tecidos e no material necrótico em que se aninham os trofozoítos virulentos em forma "histolytica", como no tratamento de formas clínicas de amebíase. Bastarão doses menores, calculadas de modo a assegurar, após cada administração, con-

centrações seguramente ativas apenas na luz do intestino grosso, sede dos trofozoítos em forma "minuta", que aí podem levar vida saprofítica por semanas ou meses antes de se transformarem em parasitas dos tecidos (WESTPHAL [28]).

É natural que o uso diário do medicamento certamente poderia impedir 100% das infecções. Todavia, do que foi dito é evidente que na maior parte dos casos, mesmo a administração periódica, que por exemplo garanta, uma vez por semana, a destruição das amebas presentes na luz intestinal, poderá dar resultados equivalentes.

Medicamentos já usados na quimioprofilaxia — Ao contrário do que sucede com a malária, a quimioprofilaxia da amebíase até hoje não foi adotada em larga escala. Entretanto, já têm sido executadas provas, usando derivado orgânico do arsênico, o *milibis* (HOEKENGA [20], BERBERIAN & col.[5], BEAVER & col.[4]). Os resultados foram satisfatórios, mas o uso prolongado dêsse composto foi franca e repetidamente desaconselhado: "êle contém 15% de arsênico metálico, que é potencialmente tóxico" [1, 2]. O uso prolongado das hidroxiquinoleínas iodadas [4, 1] pode provocar fenômenos de iodismo (HRENOFF & ANDERSON [21]). Na realidade, nenhum dos medicamentos antiamebianos clássicos parece adaptar-se a essa finalidade; portanto, parece justificada a pesquisa de novo quimioprofilático antiamebiano.

A clorofenoxamida como quimioprofilático — 1) *Especificidade de ação:* Em vista disso, pensamos em explorar as possibilidades oferecidas por novo antiamebiano, a clorofenoxamida, cujas características farmacológicas se aproximam extraordinàriamente das exigidas. Ela, aliás, já se firmou no mundo como medicamento assaz eficiente contra as várias formas da amebíase intestinal (AMARAL & PIRES [3], BESSEIGE & col.[6], GARCÍA-VALDÉS & GÓMEZ NAVARRETE [16], GUIDICINI & SPREMOLLA [17], PONTES [23]). Trata-se de derivado orgânico que não contém arsênico e nem iôdo: a N-(betaoxietil)-N-(p-fenoxi(4'-nitro)-benzil)-dicloracetamida, cujo nome químico abreviado é *clorofenoxamida.* É dotada de grande atividade antiamebiana. Sôbre 3 cepas de *E. histolytica* frente às quais foi estudada em laboratório, mostrou-se perto de 10 vêzes mais ativa do que a emetina ou a fumagilina, matando as amebas até mesmo em concentrações de cêrca de 0,5 μg/ml (DE CARNERI [11]). Essa atividade é específica; ela é ativa em menor grau (16-32 μg/ml) contra outras espécies pertencentes ao gênero *Entamoeba* (*E. moshkovskii, E. invadens*), mas é totalmente inativa contra amebas pertencentes a outros gêneros, como *Hartmannella castellani, Amoeba discoides, Amoeba spumosa* (DE CARNERI, dados não publicados). É inativa contra todos os outros protozoários estudados *in vitro* (*Trichomonas vaginalis, T. hominis, Tritrichomonas foetus, Trypanosoma cruzi, Balantidium coli*) e *in vitro* (*Lamblia* sp. do *Cricetus auratus, Trypanosoma gambiense, Plasmodium berghei*) e também contra helmintos (oxiuros e tênias do camundongo, *Schistosoma mansoni, Litomosoides carinii*). Além disso, é desprovida de qualquer ação antibacteriana e antimicótica (DE CARNERI [9, 10, 11, 12]). Esta especificidade de ação é atributo indispensável em composto destinado à quimioprofilaxia da amebíase. Em virtude de seu largo espectro de ação, que se estende mesmo às enterobactérias, medicamentos como as tetraciclinas, embora largamente usados no tratamento da disenteria amebiana, não são aconselháveis em uso prolongado, como profiláticos. Isto se deve ao fato de que, ao perturbar o equilíbrio normal da flora bacteriana intestinal, êles provocam o aparecimento de fenômenos de avitaminose e favorecem a implantação, no intestino, de cogumelos e bactérias mais resistentes, às vêzes patogênicos.

2) *Ausência de toxicidade:* Outra característica essencial para composto destinado a prolongada administração é a baixa toxicidade. A clorofenoxamida é pràticamente atóxica; a DL 50 *per os* no camundongo é superior a 5.000 mg/kg; por via endoperitonial é de cêrca de 2.000 mg/kg. A administração ao homem, de doses de 1.500 mg por dia durante 20 dias (GARCÍA-VALDÉS & GÓMEZ NAVARRETE [16]) é perfeitamente tolerada. GUIDICINI & SPREMOLLA [17] controlaram, por meio de diversos testes, a função hepática, o comportamento da crase sanguínea e o quadro protéico do sôro em 15 indivíduos tratados com 1.500 mg por dia, du-

rante 10 dias, sem notar alteração alguma. Em vários países e, particularmente no Brasil, foram tratados milhares de casos de amebíase aguda e crônica, nunca se tendo verificado distúrbio algum.

3) *Ação eletiva no intestino:* Esta falta de toxicidade, em parte, provàvelmente, é devida também à pouca solubilidade do medicamento em meio aquoso (cêrca de 3 μg/ml) e à relativamente fraca absorção intestinal da clorofenoxamida.

Esta última característica também é indispensável a quimioprofilático destinado a agir na luz do intestino grosso, sede da infecção amebiana primária. De fato, medicamentos como a emetina, ativíssimos *in vitro* contra a *E. histolytica* (cêrca de 10 μg/ml) e bastante eficazes contra as amebas aninhadas nos tecidos (disenteria amebiana aguda, hepatite amebiana), não têm efeito algum sôbre as amebas em forma "minuta", que infestam a luz do ceco e do cólon, porque não as atingem, em virtude de serem completamente absorvidos no delgado (KUENEN & SWELLENGREBEL [22]).

4) *Velocidade de ação:* Como a fumagilina, a emetina e outros medicamentos (DE CARNERI [11]), ela acarreta a morte das amebas depois de contato mantido pelo menos por 24 horas. Todo tratamento deve, por isso, garantir na luz do intestino grosso, concentrações ativas por suficiente período de tempo. Para poder estabelecer posologia que ofereça garantia de sucesso, parece-nos indispensável seguir a curva de eliminação da droga nas fezes.

MATERIAL E MÉTODOS

A clorofenoxamida utilizada neste trabalho foi o produto denominado "Mebinol" da Casa "Carlo Erba".

As provas no homem foram executadas em voluntários sãos de várias idades.

Níveis fecais — Para a determinação dos níveis fecais do medicamento, como experiência inicial, 11 indivíduos isentos de distúrbios intestinais foram tratados por via oral com 500 mg de clorofenoxamida 2 vêzes por semana, durante 3 semanas. Numa segunda experiência, dois dos indivíduos do grupo precedente foram tratados com 250 mg por dia, durante 10 dias consecutivos e, em seguida, com a mesma dose 2 vêzes por semana. As fezes eliminadas, a cada 24 horas eram reunidas individualmente e se procedia à dosagem química e microbiológica da droga em amostra homogênea colhida diàriamente.

Níveis sanguíneos — Para a dosagem dos níveis sanguíneos, 125, 250, 500, 1.500 mg foram administrados pela manhã após o café, a 4 grupos de 4 voluntários cada um. Retiraram-se 10 ml de sangue da veia cubital de cada indivíduo, após 2, 5, 10, 18, 26, 36, 48 horas e o medicamento presente no sôro foi dosado sòmente pelo método químico. Foram feitas também dosagens cromatográficas em papel.

Quantidade excretada pela urina — Dois indivíduos de cêrca de 30 anos de idade foram tratados com 250 mg. Recolheu-se tôda a urina de 56 horas e foi feita a dosagem por via química. Na urina recolhida após as 56 horas não mais se encontra a droga, nem seus derivados.

Dosagem química — Para pôr em evidência a clorofenoxamida presente nas fezes, 5 g delas foram tratados com 20 ml de álcool etílico absoluto. Sôbre parte do extrato executa-se a dosagem química, reduzindo o nitro grupo aromático da clorofenoxamida com tricloreto de titânio, diazotando a arilamina que assim se forma, copulando o sal de diazônio com a alfanaftiletilenodiamina e lendo a densidade óptica a 570 milimicron com espectrofotômetro Beckman DU. Para a dosagem no sôro e na urina, desproteiniza-se com álcool etílico e depois procede-se como acima.

Dosagem cromatográfica — Boa separação da clorofenoxamida de sua base secundária, da clorofenoxamida reduzida e da base secundária reduzida, obtém-se sôbre papel Whatman nº 1 com isopropanol-água 80:20, usando o método ascendente. As respectivas Rf são 0,95 — 0,68 — 0,88 — 0,40.

Dosagem microbiológica — Cinco ml do extrato alcoólico fecal foram transferidos para uma proveta de bacteriologia, e secos à

temperatura ambiente em dessecadores a vácuo. O resíduo foi retomado com 0,2 ml de álcool absoluto e uma gôta de Tween 80, removido para o meio monofásico de Pavlova para a cultura de amebas (proporção da diluição, com respeito às fezes de partida — 1/5) e diluído em série. Procedeu-se, assim, à determinação da atividade antiamebiana *in vitro*, usando a cepa EdM da *E. histolytica* e lendo os resultados ao microscópio após 48 horas de incubação a 37°C (DE CARNERI [11]). É de notar que, em correspondência com diluições compreendidas entre 1/5 e 1/10, as amebas são freqüentemente inibidas pelo álcool e pelo Tween presentes, e também por outras substâncias extraídas das fezes. Por isso, não se pode atribuir com certeza à presença da droga, atividade que se limite a êsse nível.

RESULTADOS

A clorofenoxamida nas fezes humanas após a administração de 500 mg duas vêzes por semana — A figura 1 ilustra o andamento da eliminação do medicamento nas fezes de indivíduo tratado duas vêzes por semana com 500 mg do medicamento. Quadros semelhantes também se obtiveram nos outros 10 casos estudados. Os dados das dosagens químicas são expressos em $\mu g/g$ de fezes; os das dosagens microbiológicas representam a proporção máxima de diluição do extrato fecal ainda dotado de atividade antiamebiana esterilizante. Naturalmente, êste último tipo de dosagem é menos preciso do que o primeiro.

Fig. 1 — Paciente tratado com 500 mg de clorofenoxamida por dia, duas vêzes por semana (nas datas indicadas pelas setas). Atividade antiamébica das fezes: a linha cheia representa o teor de R-NO_2 em µg/g de fezes; a linha interrompida representa a diluição máxima do extrato fecal ativo in vitro.

Do gráfico, resulta que por um ou dois dias, às vêzes três após a administração, estão presentes nas fezes quantidades do medicamento seguramente ativas contra a *E. histolytica*. Durante os 20 dias levados em consideração, êle foi administrado 6 vêzes, depois de cada uma das quais sua quantidade se elevou mais ou menos ràpidamente, até um máximo compreendido entre 167 $\mu g/g$ e 3.500 $\mu g/g$. Cada máximo é seguido do declínio mais ou menos rápido, que foi estudado após 5 dentre as 6 administrações. Em um caso, em correspondência com o mínimo compreendido entre dois máximos, a concentração de clorofenoxamida era certamente ainda suficiente para matar as amebas. Em correspondência com 2 outros mínimos, certa quantidade da droga foi posta em evidência sòmente por via química; em correspondência com os outros 2 mínimos, ela estava ausente. Sôbre um total de 20 dias de tratamento, em 3 (15%) o medicamento estava ausente; em outros 4 dias (20%) êle se achava presente em concentrações provàvelmente eficazes; em 13 (65%) estava presente em quantidades francamente abundantes.

Presença nas fezes, após administração diária e posteriormente bissemanal de 250 mg — Em 2 dêsses indivíduos, foi em seguida experimentado tratamento diferente, consistindo na administração de um comprimido (250 mg) por dia, durante 10 dias e depois um comprimido 2 vêzes por semana. A figura 2 mostra a eliminação do medicamento nas fezes do mesmo indivíduo de que trata a figura 1. A administração diária de 250 mg, prolongada por mais alguns dias, garante níveis muito altos do medicamento durante todo o período de tratamento. A administração bissemanal dá um quadro de máximos e mínimos correspondente ao já descrito para as doses duplas.

Estado da droga nas fezes — Mesmo com doses diárias de 250 mg, grande quantidade do medicamento permanece sem se dissolver, mas desempenha a função de corpo residual, garantindo na luz intestinal concentração

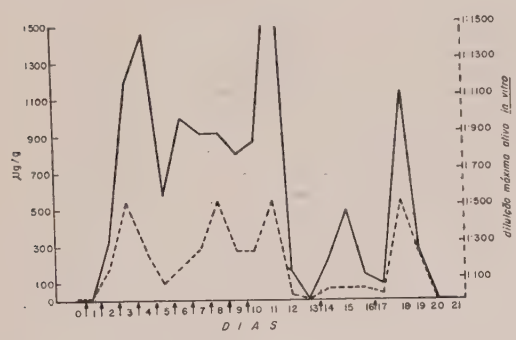


Fig. 2 — Paciente tratado com 250 mg de clorofenoxamida por dia, durante 10 dias seguidos e, depois, duas vêzes por semana (nas datas indicadas pelas setas).

ativa constante. A maior parte do medicamento expelida com as fezes ainda se acha em forma cristalina. Isso foi confirmado, suspendendo, num pouco d'água, fezes com maior ou menor teor de clorofenoxamida, submetendo-as a vigorosa agitação mecânica e passando-as logo depois por filtros bacteriológicos com poros do diâmetro de 1 micron. A concentração de nitro-derivados aromáticos no filtrado oscila entre 7 e 9 µg por grama de fezes. Não obstante, a análise cromatográfica em papel revela que mais da metade do total é constituída por base secundária (que deriva do fármaco por hidrólise do radical dicloracético e é inativa sôbre as amebas), ao passo que a droga está sempre presente em concentração constante, vizinha de 3 µg/ml. A dosagem colorimétrica também revela no filtrado a presença de certa quantidade de arilaminas aromáticas (8-15 µg/g de fezes). Estas derivam, em grande parte, da clorofenoxamida reduzida (isto é, com o nitrogrupo transformado em aminogrupo) e da base secundária reduzida: o primeiro composto é dotado de atividade antiamebiana da mesma ordem da do medicamento e exerce, por isso, ação terapêutica; o segundo composto é inativo.

Níveis sanguíneos — A dosagem dos níveis sanguíneos, após uma única administração de diferentes quantidades, também confirma que doses bem baixas são suficientes para saturar o intestino. Evidentemente, o excesso de medicamento não dissolvido não pode influir na absorção intestinal e, portanto, em sua concentração sanguínea. Já com 125 mg se obtém no homem níveis sanguíneos da droga e derivados, pràticamente idênticos aos obtidos com as doses de 250, 500 ou 1.500 mg (vide quadro 1). A cromatografia em papel mostra que no sôro ela se apresenta juntamente a alguns de seus derivados metabólicos.

Quantidade excretada na urina — Administrando doses únicas de 250 mg a duas pessoas de 25 e 32 anos, encontraram-se na urina sòmente 20 mg de seus derivados metabólicos, isto é, 8% da dose ingerida. A cromatografia em papel mostra que o medicamento está pràticamente ausente da urina: acha-se presente quase exclusivamente um seu derivado, cuja atividade e identidade estão em fase de estudo.

COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

Pelo que acabamos de ver, a administração ao homem, de um comprimido de 250 mg de clorofenoxamida, garante em seu intestino concentrações seguramente amebicidas, muitas vêzes por mais de 2 dias, mas, às vêzes, por apenas 24 horas. Tal período de tempo útil está condicionado à velocidade de evacuação do conteúdo intestinal; mesmo dobrando a dose (administração contemporânea de 2 comprimidos), a duração de concentrações eficazes do medicamento não aumenta obrigatòriamente. Levando em conta o longo tempo de contato (24-30 horas) necessário para êste derivado dicloracetamídico acarretar com segurança a morte de tôdas as amebas, pode-se prever que uma única dose semanal, na grande maioria dos casos, deveria ser suficiente para eliminar as amebas recém-instaladas na luz intestinal, após a ingestão de cistos, mas de vez em quando poderia resultar insuficiente. Se isto acontecesse, a esterilização do intestino não se procederia a cada semana, porém num ritmo irregular, diferente de indivíduo para indivíduo e pràticamente incontrolável.

Dever-se-ia, ao contrário, obter efeito profilático seguro administrando aos indivíduos expostos à infecção um comprimido por dia, durante dois dias consecutivos de cada semana, por todo o período de permanência na zona endêmica. Entretanto, em caso de

QUADRO I

Média dos níveis sanguíneos de nitroderivados aromáticos no homem após uma única administração de diferentes doses de clorofenoxamida por via oral. (Valores expressos em μg/ml de sôro)

Dose única em mg	*Nº de casos*	*Dados obtidos após*						
		2 horas	*5 horas*	*10 horas*	*18 horas*	*26 horas*	*36 horas*	*48 horas*
125	4	2,3 ± 0,3	4,9 ± 0,4	4,3 ± 0,4	3,3 ± 0,3	3,0 ± 0,3	1,8 ± 0,0	0,0
250	4	3,0 ± 0,2	5,5 ± 0,2	4,6 ± 0,6	3,4 ± 0,6	2,6 ± 0,4	1,8 ± 0,2	0,0
500	4	2,6 ± 0,3	5,0 ± 0,5	4,9 ± 0,4	3,6 ± 0,4	2,8 ± 0,3	1,9 ± 0,1	0,0
1500	4	2,1 ± 0,2	5,6 ± 0,5	5,1 ± 0,9	3,0 ± 0,8	2,2 ± 0,4	1,4 ± 0,1	0,0

As diferenças entre os níveis hemáticos averiguados após os tempos correspondentes, em conseqüência da administração de doses variando entre 125 e 1500 mg de clorofenoxamida, analisadas mediante o *t* de Student, não são, até as 26 horas, estatìsticamente expressivas.

Em virtude de a clorofenoxamida ser pouco solúvel em meio aquoso, mesmo as doses menores são suficientes para saturar o conteúdo intestinal, deixando sempre uma certa quantidade de fármaco não dissolvida, que vem expelida nas fezes como tal.

Os níveis hemáticos, portanto, não são proporcionais às doses administradas, e sim, à quantidade constante do fármaco dissolvida no intestino.

diarréia seria prudente repetir mais de uma vez, durante cada um dos 2 dias, a administração de 1 comprimido, para evitar que a dose total diária seja ràpidamente evacuada com as fezes.

Como foi amplamente referido em precedente trabalho (DE CARNERI [9]), os dados encontrados na literatura sôbre o ritmo ótimo para a administração de antiamebianos com finalidades profiláticas em zonas endêmicas confirmam a eficácia dêsse esquema de tratamento. Isto significa que, na maior parte dos casos, a vida puramente comensal da *E. histolytica* na luz intestinal se prolonga bastante, de modo que as infecções adquiridas nos cinco dias compreendidos entre dois tratamentos, não têm tempo de interessar os tecidos da parede intestinal.

No caso da clorofenoxamida, a falta de toxicidade, a alta seletividade de ação e as outras características acima descritas, permitem levar em consideração também um tratamento contínuo, na base de um comprimido por dia, a adotar-se em caso de epidemias ou em zonas nas quais a disenteria amebiana seja particularmente freqüente.

Estas são as conclusões a que nos leva o nosso estudo preliminar, mas é evidente que a confirmação definitiva sôbre a eficácia dêste medicamento como quimioprofilático antiamebiano e sôbre a dosagem e ritmo ótimo de administração, só se poderá obter depois de exaustivas provas práticas em zonas endêmicas. Se estas derem resultado positivo, teremos nesse medicamento elemento favorável ao largo emprêgo em zonas tropicais e subtropicais econômicamente débeis, dado o baixo preço em que pode ser pôsto no mercado.

NOTA — Muito recentemente, SHAH (trabalho em curso de impressão) estudou cuidadosamente a eficácia da clorofenoxamida como quimioprofilático antiamebiano em um bairro de Bombaim, onde 34% dos indivíduos de um grupo de contrôle não tratado estavam afetados por *E. histolytica*.

Depois de 15 semanas de profilaxia bissemanal, em dias distanciados, com 500 mg de clorofenoxamida, nenhum dos submetidos ao tratamento profilático mostrou-se infetado. Êste esquema que, de acôrdo com as pesquisas laboratoriais aqui relatadas, deveria ser o menos seguro, teve resultados positivos em 100% dos casos.

SUMMARY

Chlorophenoxamide as a possible anti-amoebic chemoprophylactic agent.

Present knowledge regarding the frequency of parasitoses due to *E. histolytica* and the distribution of amoebic dysentery in the world are briefly reviewed. It is concluded that chemoprophylactic treatment is necessary in highly endemic tropical and subtropical areas. Drugs containing arsenic or iodine, commonly used in chemotherapy of amoebiasis, cannot be administered for long periods in chemoprophylaxis because of their possible chronic toxicity and sensitizing activity; furthermore, antibiotics have an unfavourable effect on the normal intestinal flora. Chlorophenoxamide, to the contrary, reveals numerous favourable characteristics.

This drug is active *in vitro* on *E. histolytica* at doses of less than 1 μg/ml after a period of 24 to 30 hours contact. This activity has been confirmed in laboratory animals. A large number of clinical experiments carried out in various parts of the world have demonstrated that doses of 1,500 mg daily, for 10 or more days, are extremely efficacious in the treatment of the various forms of intestinal amebiasis. This activity is highly specific; the drug is absolutely innocuous to the normal intestinal bacterial flora. No toxic or allergic reactions are observed in laboratory animals or in man, even after prolonged administration of the drug.

The drug is stable at the gastric and intestinal pH and is not affected by bacterial and gastroenteric enzymes. The excretion curves in the feces of 13 subjects were followed daily for three weeks, by means of chemical and microbiologic tests. Chlorophenoxamide is only poorly absorbed from the intestine: quantities much higher than those necessary to kill the amoebae are found in the feces for 24 hours or longer after every twice-a-week administration of 500 mg, or even after a single 250 mg tablet.

On administering 250 mg of the drug to man, only 20 mg (8%), consisting mainly of the metabolites, are excreted in the urine.

Comparing chlorophenoxamide's speed of action with the rate of its excretion in the feces after a single dose, it can be concluded that the best results in prophylaxis should be obtained by basing treatment on 1 tablet daily or else on 1 tablet daily for two consecutive days, every week. However, recent field experiments in India have shown that twice-a-week doses of 500 mg chlorophenoxamide on separate days also give excellent results. In fact, it was possible to obtain 100% prophylaxis in areas where 34% of the subjects of a non-treated group were found to be infected with *E. histolytica*.

REFERÊNCIAS

1 — Prophylaxis of amebiasis. J. Am. Med. Assoc. **164**:505-506, 1957. (Editorial)

2 — Prophylaxis of amebiasis. J. Am. Med. Assoc. **166**:430, 1958. (Editorial)

3 — AMARAL, A. D. F. & PIRES, C. D. de A. — Ação da dicloroacetamida sôbre a *Entamoeba histolytica*. Rev. Med. Cir. São Paulo **18**:205-219, 1958.

4 — BEAVER, P. C.; JUNG, R. C.; SHERMAN, H. J.; READ, T. R. & ROBINSON, T. A. — Experimental chemoprophylaxis of amebiasis. Am. J. Trop. Med. & Hyg. **5**:1015-1021, 1957.

5 — BERBERIAN, D.; DENNIS, E.; KORNS, R. & ANGELO, C. — Drug prophylaxis of amebiasis. J. Am. Med. Assoc. **148**:700-704, 1952.

6 — BESSEIGE, H.; RIGAUD, J. L. & TRAPET, P. — Quelques réflexions sur l'amibiase asiatique à propos de l'emploi d'un dérivé de la dichloroacétamide. Gazz. sanit., éd. franç. **8**:31-36, 1959.

7 — BRUMPT, E. — Précis de Parasitologie. 6e. éd. Paris, Masson, 1949.

8 — CRAIG, C. F. — The medicinal prophylaxis of amebiasis. Am. J. Trop. Med. **20**:799-801, 1940.

9 — de CARNERI, I. — Le basi biologiche della chemioprofilassi dell'amebiasi. (No prelo)

10 — de CARNERI, I. — Due novi antiamebici: la N-(beta-ossietil)-N-(p-fenossi-(4'nitro)-benzil)-dicloroacetamide ed il suo etere etilico. Giorn. Mal. infett. e parass. **10**:850-852, 1958.

11 — de CARNERI, I. — Spezifität und Geschwindigkeit der Wirkung zweier verschiedener Reihen von Dichloroacetamid-Derivaten auf 3 *Entamoeba*-Arten. Ztschr. Tropenmed. u. Parasitol. **9**:32-42, 1958.

12 — de CARNERI, I. — The use of specific anti-amoebic drugs for comparative taxonomic studies. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. **53**:120-121, 1959.

13 — FAUST, E. C. — Amebiasis. Springfield, Charles C. Thomas, 1954.

14 — FAUST, E. C. & RUSSEL, P. F., ed. — Craig and Faust's Clinical Parasitology. 6th. ed. London, Kimpton, 1957.

15 — FISCHER, L. & REICHENOW, E. — Amoebiasis. (*In* MOHR, L. & STAEHELIN, R. — Handbuch der inneren Medizin. Berlin, Springer, 1952. **2**:616-666)

16 — GARCIA-VALDÉS, V. M. & GÓMEZ NAVARRETE, H. — Tratamiento de la amibiasis intestinal con un nuevo amebicida: el N-(beta-oxietil)-N-p-fenoxibencil-(4'nitro)-dicloroacetamida. Prensa med. mexic. **24**(6):I-II, 1959.

17 — GUIDICINI, F. & SPREMOLLA, G. — Trattamento dell'amebiasi intestinale con N-(beta-ossietil)-N-(p-fenossi-(4'nitro)-benzil)-dicloroacetamide o chlorophenoxamide. Osservazioni cliniche. (No prelo, em Gazz. sanit.)

18 — HOARE, C. A. — Amoebiasis in Great Britain, with special reference to carriers. Brit. Med. J. **2**:238-241, 1950.

19 — HOARE, C. A. — The commensal phase of *Entamoeba histolytica*. Exper. Parasitol. **1**:411-427, 1952.

20 — HOEKENGA, M. — The prophylaxis of malaria and amebiasis with Milibis-Aralen. J. Lab. & Clin. Med. **39**:267-270, 1952.

21 — HRENOFF, A. K. & ANDERSON, H. H. — Treatment of amebiasis: toxicity to macaques of the suppressive drug dicholorosalicylanilide. Antibiot. Ann. p. 95-103, 1958/59.

22 — KUENEN, W. A. & SWELLENGREBEL, N. H. — Die Entamoeben des Menschen und ihre praktische Bedeutung. Zentralbl. f. Bakt., Abt. I., Originale **71**:378-410, 1913.

23 — PONTES, J. F., KUSMINSKY, N. & PODOLSKY, W. — Tratamento da amebíase intestinal por um derivado da dicloroacetamida (clorofenoxamida). Rev. brasil. Gastroenterol. **11**:177-182, 1959.

24 — RADKE, R. A. — The military significance of amebiasis. Mil. Surg. **112**:18-31, 1953.

25 — SARKISYAN, M. A. — Amebiasis morbidity and the carriage of *Entamoeba histolytica* in an endemic focus. Med. Parazitol., Moscou (4):311-315, 1955. (res. em Biol. Abstr. **32**(6746), 1958)

26 — SHAH, J. R. — Chemo-prophylaxis in amoebiasis with Mebinol. (no prelo)

27 — WESTPHAL, A. — Amöbenruhr auf Santo Domingo. Ztschr. Tropenmed. u. Parasitol. **1**:225-230, 1949.

28 — WESTPHAL, A. — Betrachtungen und experimentelle Untersuchungen zur Virulenz der *Entamoeba histolytica* beim Menschen. Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. **41**:262-279, 1937.

29 — WESTPHAL, A. — Globale Verbreitung der Amöbenruhr und *E. histolytica* 1903-1953. Welt-Seuchen Atlas **2**(II):113-116 e 64-046/I. Hamburg, Fulte-Verlag, 1956.

30 — WESTPHAL, A. — Zur Epidemiologie und Pathogenese der Amöbenruhr in Nordafrika 1941-42. Z. Hyg. **128**:73-86, 1948.

Recebido para publicação em 6 outubro 1959.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(1):17-28, janeiro-fevereiro 1960

THE PATHOLOGY OF EXPERIMENTAL CHAGAS' DISEASE IN MICE: I. DIGESTIVE TRACT CHANGES, WITH A REFERENCE TO NECROTIZING ARTERITIS

Masayuki OKUMURA [1], Thales de BRITO [2], Luiz Hildebrando PEREIRA DA SILVA [3], Alberto CARVALHO DA SILVA [4] and Alípio CORRÊA NETTO [5]

SUMMARY

Experimental Chagas' disease was produced in mice, and the lesions of the digestive tract studied from the 21st up to the 170th day of infection. Typical megacolon was not reproduced but a moderate dilation of the bowel was seen in 20% of the cases. A recurrent focal myositis of the bowel smooth musculature was found, with secondary focal and also recurrent plexuses destruction. The lesions are similar to the ones seen in the esophagus and colon musculature of patients with megacolon and megaesophagus.

Also found, a necrotizing arteritis which affects the small arteries beneath the peritoneal lining and occasionally, the aorta and the coronary artery. The lesion is similar to those described in diseases with a background of hypersensitivity, thus being an allergic angiitis. Since its frequency increases when blood parasites decrease, it may be related to antigen antibody mechanism, the former being probably the *Trypanosoma cruzi* itself and/or its products. A critical survey of other pathogenic mechanisms which could produce the same lesion was presented.

Necrosis of the peritoneal fat was seen at the first phases of the disease, being related to an acute pancreatitis.

INTRODUCTION

CHAGAS himself [5] was the first to suggest that the disease called "mal de engasgo" (Megaesophagus) could be a manifestition of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). Recently KOEBERLE [13, 17] claimed that Chagas' disease depends on a primary noxious effect, acting chiefly through changes on the autonomic nervous system. The parasite would be able to produce a so-called "neurotoxin" capable of injury to the autonomic and also, to a certain extent, the central nervous system [15]. This hypothesis would explain not only the cardiac manifestations of the disease but the plexuses destruction seen in megaesophagus and megacolon [14, 16].

According to KOEBERLE [15, 17], even pulmonary bronchiectasis in patients with Chagas' disease could have a similar origin.

Serology has shown a high incidence of positive complement fixation test (Guerreiro-

Fac. Medicina Univ. São Paulo — 1ª Clínica Cirúrgica, Section of Experimental Surgery (Prof. A. Corrêa Netto); Depart. Microbiol. and Immunol. (Prof. C. S. Lacaz); Depart. Parasitol. (Prof. A. D. F. Amaral); and Depart. Physiol. (Prof. F. Moura Campos).

(1) Surgeon.
(2) Pathologist.
(3) Parasitologist.
(4) Associate Professor of Physiology.
(5) Professor of Surgery.

Machado test) in patients with megaesophagus and megacolon [24].

In a previous paper [4], studying biopsies from the cardia in patients with megaesophagus, BRITO & VASCONCELOS, were able to confirm most of the morphologic observations of KOEBERLE [14]. However, a noxious effect mediated through a "neurotoxin" was considered so far unproved. It seemed to us that plexuses destruction was achieved through a recurrent inflammatory process, which appeared mainly as an allergic response to degenerate leishmanial forms when they are set free from their pseudocyst inside the smooth muscle fiber.

It is the purpose of this paper to report on the lesions of the digestive tract in mice experimentally infected with a sublethal dosis of *Trypanosoma cruzi*, in an attempt to reproduce megacolon. Also, we want to point out the presence of a necrotizing arteritis, seen by us for the first time.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out on 43 male white mice weighing 24-33 g. The diet used was as follows:

a) *Composition of the diet:*

1)	Casein	20%
2)	Fat	10%
3)	Sugar	66%
4)	Salt mixture (Phillips-Hart) ..	4%

Four to five g are to be given to each animal daily.

b) *Vitamins:*

1)	Thiamine	1.00 mg
2)	Riboflavine	1.00 mg
3)	Vit. K (Menadione)	1.00 mg
4)	PABA	1.00 mg
5)	Pyridoxine	1.00 mg
6)	Calcium panthotenate ..	2.00 mg
7)	Nicotinic acid	10.00 mg
8)	Folic acid	0.50 mg
9)	Biotin	0.02 mg
10)	Inositol	10.00 mg
11)	Choline	300.00 mg
	q.s.p.	1.00 ml

Add 5 ml of the solution to each kg of diet.

Fat-soluble vitamins:

1)	Vitamin A	600 U.I.
2)	Vitamin D	150 U.I.
3)	Vitamin E	1 mg
	q.s.p.	1 ml

Give one drop of the solution to each animal daily.

c) *Salt mixture (Phillips-Hart):*

Sodium chloride	335.0 g
Potassium phosphate (Bibasic) $3H_2O$	845.0 g
Calcium phosphate $4H_2O$	190.0 g
Magnesium sulphate $7H_2O$	204.0 g
Calcium carbonate	600.0 g
Iron citrate $6H_2O$	55.0 g
Potassium iodide	1.6 g
Manganum sulphate	0.7 g
Zinc chloride	0.5 g
Copper sulphate	0.6 g

Intraperitoneal inoculation was performed, 0.2 ml of citrated mice blood diluted in Tyrode's solution and containing about 20.000 *Trypanosoma cruzi* (Y strain) being used [32]. The animals also received 200 U. of penicillin. The strain used in these conditions usually kills about 50% of the inoculated animals.

The mice were divided in ten groups, being sacrificed periodically from twenty one days after inoculation up to one hundred and seventy days. Only two animals, belonging to the last group were reinoculated. Parasite counting (average of 50 microscopic field, 400×) were done weekly until the end of the experiment.

The mice were killed using ether anesthesia. The bowel was cut with the animal still alive. The colons were rolled over themselves, embedded in paraffin and cut 5-6 micra thick. This technique allowed us to examine most of the colon in one slide.

The routine stain was hematoxylin-eosin. When necessary, PAS-hematoxylin, Weigert-Van Gieson and the Nissl's methods were employed.

The following controls were used:

1) Normal animals, breeding in the same diet. Three or four were killed with each group.

2) Nine animals received a similar dose of *Trypanosoma cruzi* subcutaneously, being killed twenty days afterwards in order to see the differences of intestinal damage in relation to the group receiving the intraperitoneal inoculum.

3) Ten animals received citrated mice blood and penicillin but no trypanosomes. The dosage was the same as for the group receiving trypanosomes. In five animals the subcutaneous route was employed and in the others the intraperitoneal route was used. Six animals were killed after 90 days and four after 110 days, in order to see if necrotizing arteritis would be reproduced without trypanosomes.

RESULTS

a) *Macroscopic examination* — Moderate dilatation of the bowel was seen in 20% of the cases;

b) *Microscopic examination.*

Examination of the peritoneum has disclosed firstly a chronic inflammatory infiltrate, mainly perivascular, with or without vascular congestion. The infiltrate was conspicuous up to the 32nd day after inoculation, being discrete but never completely absent until the end of the experiment. The second manifestation was fat necrosis, also conspicuous until the 32nd day. Three animals have shown extensive necrosis, the necrotic fat tissue appearing as a shadow, surrounded and circumscribed by a chronic inflammatory process, made up of hystiocytes and lymphocytes, chiefly around small vessels. Free or phagocytazed leishmanial forms could be observed in the infiltrate (Fig. 1).

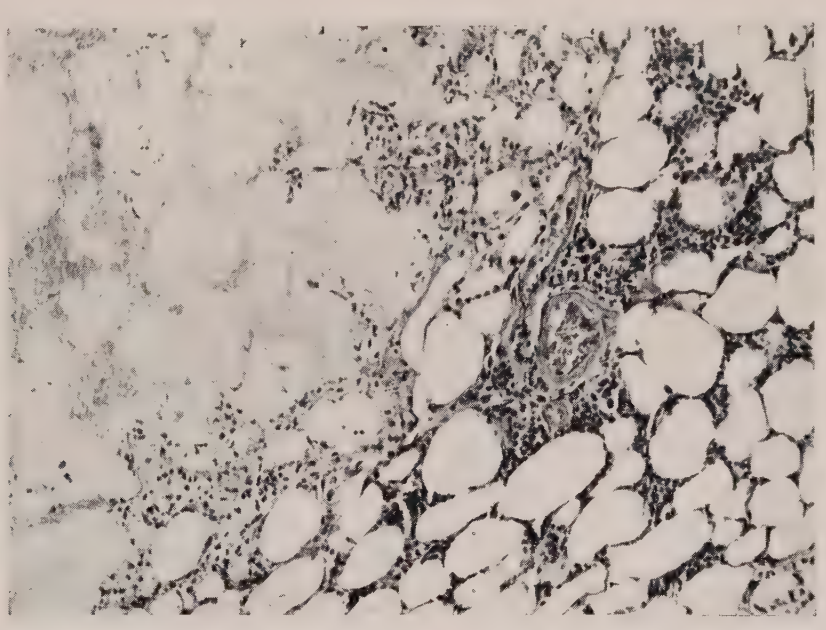


Fig. 1 — Area of peritoneal fat necrosis, surrounded by chronic inflammation. 25 days after inoculation. (Stain: HE 120×)

After the 32nd day healing began to take place in the areas of fat necrosis, being characterized by the appearance of giant cells with foamy cytoplasm and a more marked peripheral chronic inflammatory process, in which fibroblasts were seen in varying numbers. Small deposits of calcium have been observed focally in the necrotic area. The above mentioned findings were better seen in five animals of all series.

Closely related to fat necrosis is a pancreatitis observed when the organ was included in the bowel blocks. It was characterized

by interstitial edema, acinar cells atrophy and focal infiltrate made up of lymphocytes and hystiocytes.

Focal myositis affecting the smooth muscle of the bowel was a constant finding, being more marked nearby the anus. Fragments of striated muscle, when included, showed also an intense interstitial myositis. Myositis in the first 21 days after inoculation was made up mostly by an infiltrate of mononuclear cells, chiefly lymphocytes and hystiocytes. Thinning and diffuse hyalinization of individual muscle fibers were observed among the infiltrate. The inflammation sometimes was also present spreading to the submucosa, neutrophils and eosinophils then being found among the cells of the infiltrate. Edema was also prominent. Leishmanial forms were found inside muscle fibers either as pseudocysts or as rows of individual parasites (Fig. 2 and 5).

Throughout the bowel, focal areas of inflammatory exudate around ganglion cells were seen, being secondary to the spreading of the interstitial myositis (Fig. 3). Leishmanial forms were found around intact ganglionar cells in one instance, as reported previously by Pizzi [25].

From the 32nd day on myositis decreases in intensity but does not disappear. Scattered focally throughout the bowel, we can see elongated cells with dark nuclei circumscribing ganglion cells (Fig. 3). Residual nodules characterized by total substitution of ganglion cells by elongated hystiocytes were demonstrated occasionally (Fig. 4). Worth emphasizing is the fact that this process affects focally the plexuses, areas of intact ones being seen alternating with areas of damage. To sum up, the picture is that of a recurrent inflammatory process less and less intense, with secondary and progressive focal plexular lesion.

Late stages of the process were not usually characterized by fibrotic healing. Granulomatous reaction made up by agglomerations of vacuolated hystiocytes, around remnants of muscle fibers have been seen on the 64th day. Granulomas also appeared as a late response of the inflammatory process in the peritoneal fat.

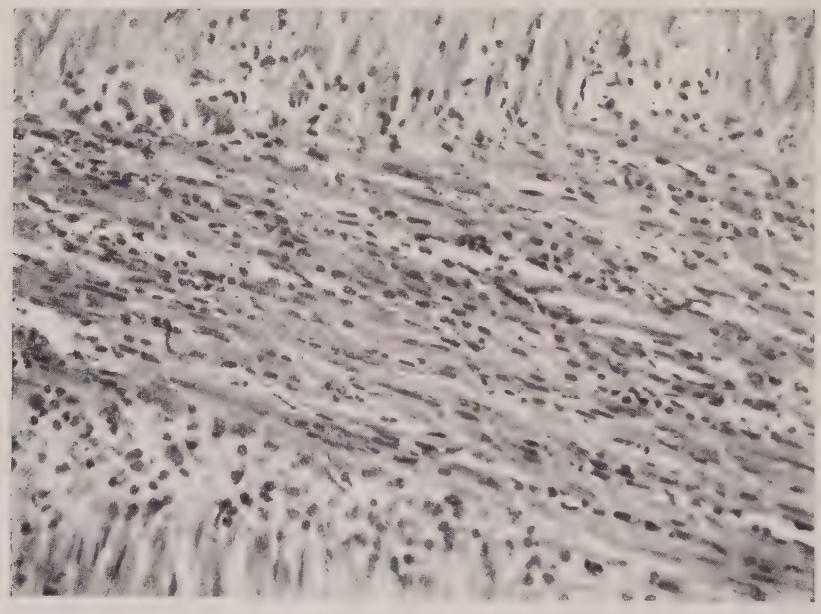


Fig. 2 — Marked interstitial myositis of the bowel. Some smooth muscle fibers show diffuse cytoplasmic hyalinization and picnotic nuclei. 21 days after inoculation. (Stain: HE 360×)

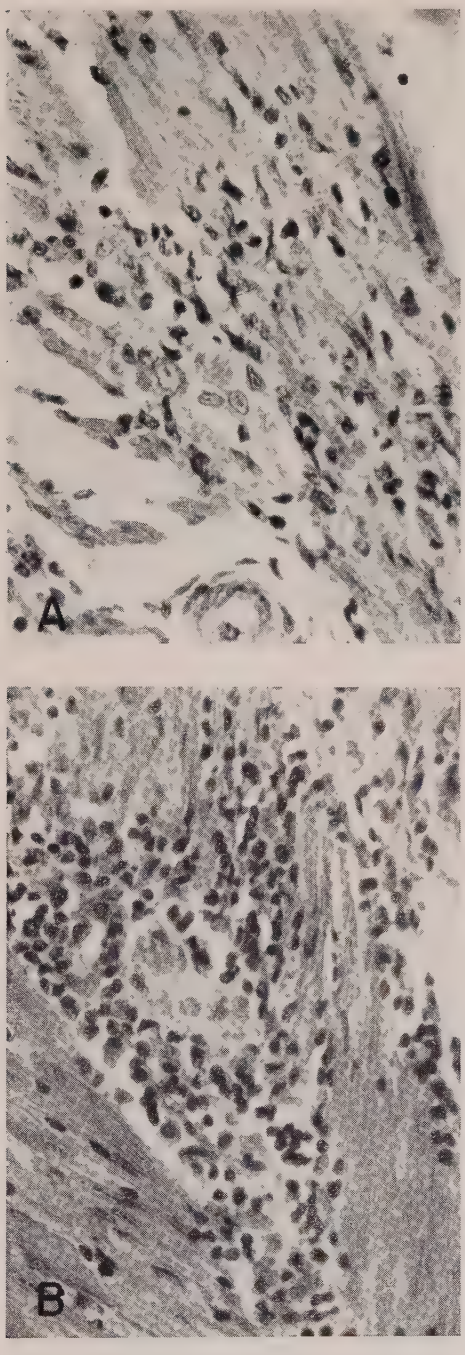


Fig. 3 — A, marked interstitial myositis with secondary plexus involvement 21 days after inoculation. B, plexus involvement 87 days after inoculation: degenerate ganglion cells surrounded by chronic inflammatory infiltrate. (Stain: HE, 360×)

A similar, but more intense pathological picture was seen in the striated muscle. Here muscular damage sometimes was followed by a sarcolemmal proliferation, giving rise to pseudo-giant cells (Fig. 6).

Periarteritis was seen frequently by us, being characterized by an inflammatory infiltrate of mononuclear cells at the adventitia of small arteries (Fig. 7). The media appeared intact, but the endothelial cells were sometimes swollen and prominent inside the lumen. Besides periarteritis, a necrotizing arteritis was seen, affecting small arteries of the striated muscles and loose connective tissue beneath the peritoneal lining of the bowel (Fig. 8). Morphologically, necrotizing arteritis appeared as a partial or total necrosis of the media, which became strongly acidophilic and PAS positive, staining in yellow with Van Gieson's and Mallory's phosphotungstic hematoxylin. Remnants of smooth muscle nuclei were occasionally observed at the necrotic area. Endothelial cells were either swollen or with picnotic nuclei. Around the affected arteriole there was an inflammatory infiltrate made up of lymphocytes and hystiocytes. Sometimes the infiltrate affected focally the adventitia. Necrotizing arteritis when present, damages longitudinal segments of arterioles, the lesion appearing in various vessels in the same slide. It appeared for the first time in one animal on the 21st day after inoculation. Among 25 mice, eight exhibited the lesion later, being distributed as follows: one on the 54th, two on the 74th, two on the 87th and three on the 160th and 170th day groups. Blood parasites decreased markedly around the 60-70th day. Arteritis increased in frequency from the 80th day on.

In an attempt to find out how disseminated the lesion was, slides of the various organs of animals with intestinal necrotizing arteritis have been examined. A segmental necrosis of the aortic root was found in one animal from the 160th day group (Fig. 9). There was focal damage of the elastic fibers, the necrotic area appearing with the already mentioned staining characteristics, surrounded by a marked hystiocytic reaction. Another animal, of the 54th day group, exhibited necrotizing arteritis of the coronary artery; the medium was completely necrotic, the ves-

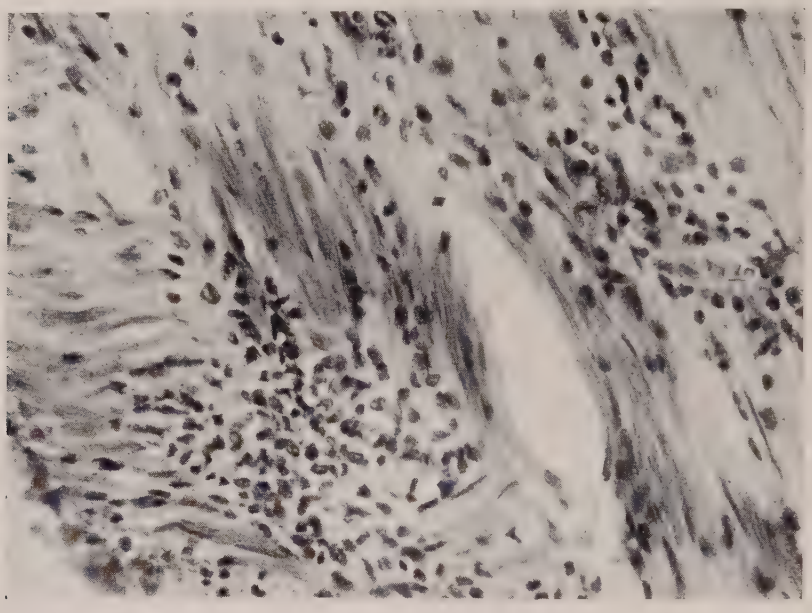


Fig. 4 — Complete plexus disappearence, with residual nodule formation. 42 days after inoculation. (Stain: HE 360×)

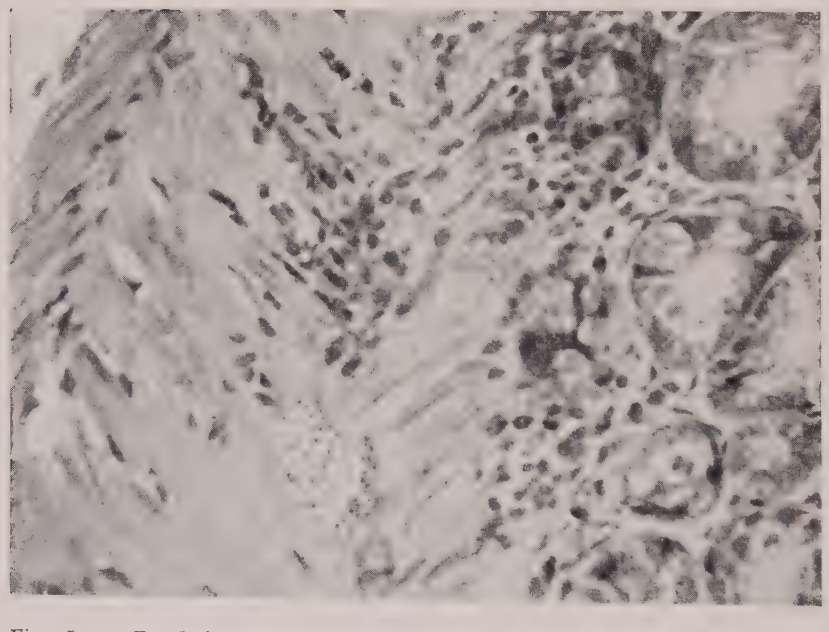


Fig. 5 — Focal interstitial myositis nearby a pseudocyst. 64 days after inoculation. (Stain: HE 360×)

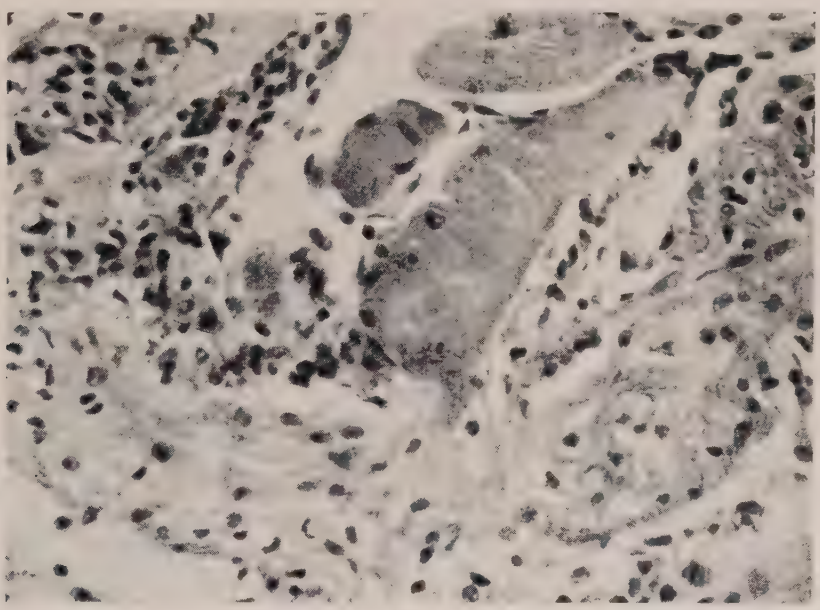


Fig. 6 — Marked interstitial myositis affecting striated muscle. The sarcolemmal pseudo-giant cell reaction is well seen. 32 days after inoculation. (Stain: HE 360×)

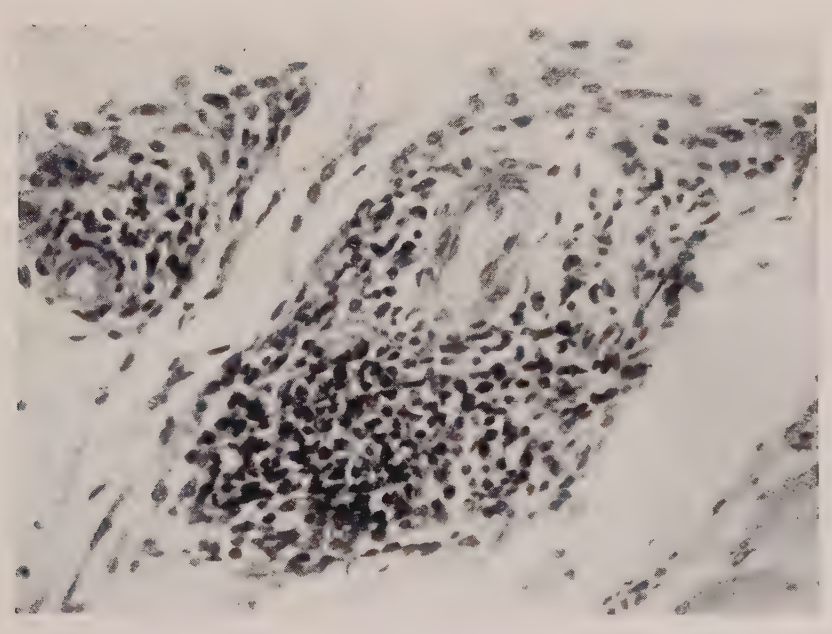


Fig. 7 — Chronic inflammatory infiltrate around small arteries, which show intact walls (Periarteritis). 54 days after inoculation. (Stain: HE 360×)

sel being surrounded by elongated histiocytes, with spider-like nuclear chromatin, similar to the ones seen in rheumatic fever (Fig. 10). Worth mentioning is the fact that both hearts exhibited Chaga's myocarditis, inflammation being seen mainly at the atria, auriculo-ventricular groove and right ventricle.

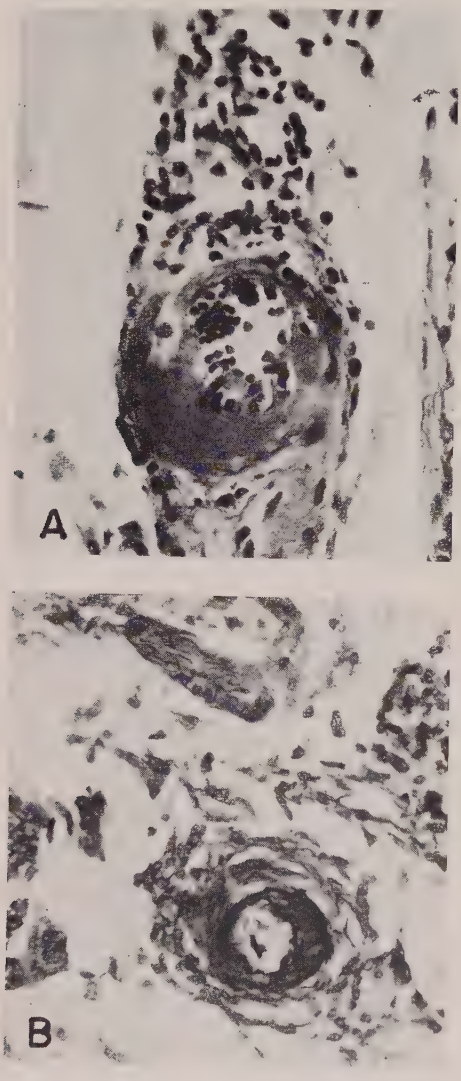


Fig. 8 — A, necrotizing arteritis of small arteries beneath the peritoneal lining of the bowel. The medium is markedly acidophilic, with remnants of smooth muscle cells nuclei. Focal round cell infiltrate at the adventitia. 161 days after inoculation. (Stain: HE 360×). B, necrotizing arteritis: the necrotic medium is markedly PAS positive. 161 days after inoculation. (Stain: HE 360×)

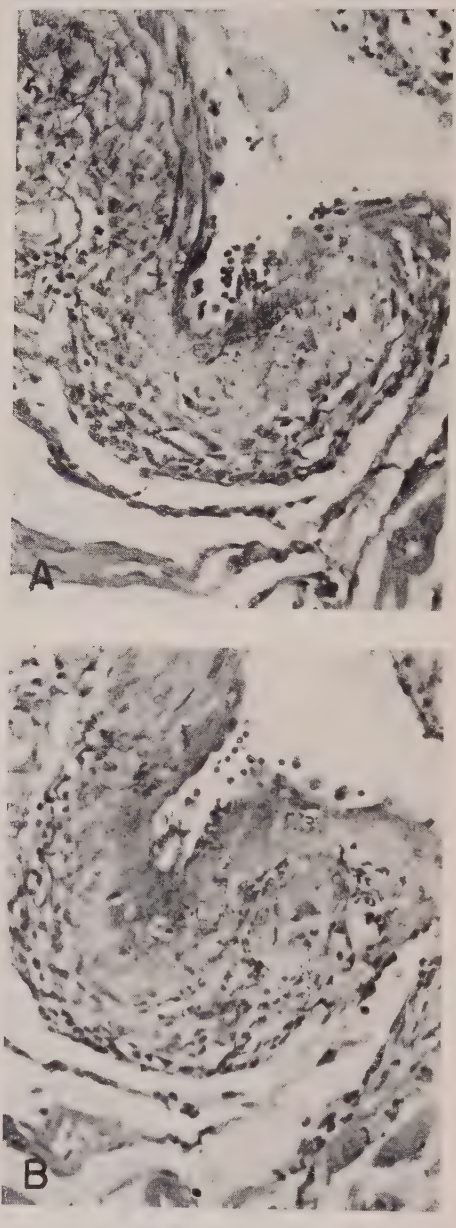


Fig. 9 — A, focal medial necrosis of the aortic root: disappearence of elastic fibers and hystiocytic proliferation nearby the adventitia. 161 days after inoculation. (Stain: Weigert-Van Gieson 300×). B, same area stained PAS and hematoxylin. The necrotic medium is markedly PAS positive. (350×)

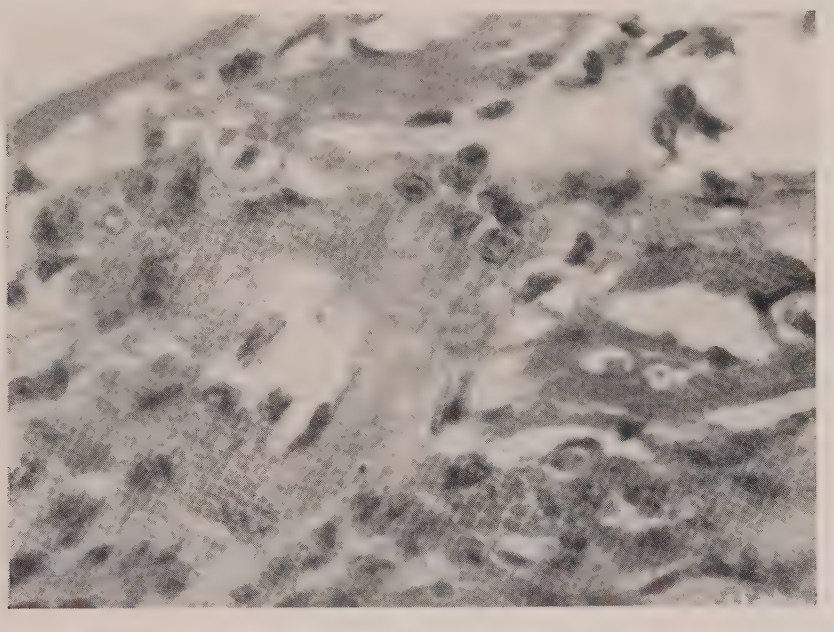


Fig. 10 — Necrotizing arteritis of coronary branch. Elongated palissading hystiocytes can be seen around the arteriole. A parasitary pseudocyst is seen inside a muscle fiber, at the left lower corner. 54 days after inoculation. (Stain: HE 620×)

Careful examination of other organs has not disclosed necrotizing arteritis.

COMMENTS

Lesions were constant in respect to their localization, but their intensity varied probably according to the natural resistance and the capacity to develop a stronger immunitary response of each animal.

Using subcutaneous route we have shown that infection is less intense, at least up to the 20th day after inoculation. However fat necrosis as well as acute pancreatitis were also seen by us on these animals. It seems, as Pizzi [27] has pointed out, that in experimental Chagas' disease there is a relation of cause and effect between acute pancreatitis and fat necrosis.

Vianna, Mayer & Rocha Lima [21, 31, 34] and others [23] have already pointed out the strong myotropic affinity of *Trypanosoma cruzi*. Myositis damaging both striated and smooth muscle is thus the rule [3, 23, 25, 8]. The leishmanial forms inside the smooth muscle initially do not evoke an inflammatory response. As soon as the parasites degenerate, muscle lesion and inflammation take place around the pseudocyst [31]. Some believe that a toxin [9, 31] is produced by the degenerating parasite. However, it seems that an allergic response to the antigenic material of the fragmented parasite plays an important role in the inflammatory response [18, 22, 26, 28].

The myositis seen in the bowel was focal, recurrent and did not disappear entirely even after 170 days. The plexuses destruction was also focal, and secondary to the muscular lesion. We were able to follow the interstitial inflammation from the mucosa down to the Auerbach's plexuses in most of the cases. If similar events take place in men, as our previous studies have suggested [4], it would be possible to explain the functional disorders seen on X-Ray examination before the establishment of megaesophagus and megacolon, as Fonseca & Toledo [11, 33] have demonstrated. The dyskinetic phase of the disease would be then

represented anatomically by focal recurrent myositis, with progressive plexuses destruction [4].

Necrotizing arteritis, similar to that seen accompanying diseases with a background of hypersensitivity [6, 12, 35, 36] was seen occasionally by MAGARINOS TORRES in the heart of a Cebus monkey experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* [20]. The presence of a necrotizing arteritis probably also related to hypersensitivity was recently seen by BRITO & VASCONCELOS [4] in patients with megaesophagus. We have shown for the first time, a similar lesion in the bowel of 9 among forty three mice experimentally infected with Chagas' disease. In addition, one of them showed a focal area of necrotizing aortitis and another a necrotizing coronary arteritis. Arteritis was more frequent at the late stages of the disease, when the blood parasites have disappeared, thus suggesting a close relationship between the establishment of the immuno-allergic state and the lesion. Extreme care must be taken in order to evaluate this finding. RICH, RICH & GREGORY [29, 30], CLARK & KAPLAN [7] have shown in men and experimental animals with serum sickness a similar necrotizing arteritis, as well as focal acute glomerulonephritis. Considering that the animals were injected with blood and that mice could have a delayed immunitary response, it seemed to us that a similar mechanism could be responsible for the lesion. Controls injected with blood and penicillin were carried out, and killed around the 90th and 110th day, a time when the lesion was more frequent. No necrotizing arteritis was found.

In spite of the fact that there is strong evidence pointing out to this necrotizing arteritis as an allergic response to *Trypanosoma cruzi* and/or its products, definite proof will be brought out only when the lesion will be reproduced with trypanosome cultures. This precaution has to be taken due to the theoretical possibility that an immune response to the blood injected could be enhanced by *Trypanosoma cruzi*, which would act as an adjuvant [10].

On the other hand, if necrotizing arteritis is really due to an antigenic effect of *Trypanosoma cruzi* and/or its products, this finding brings up another evidence of the etiological relation between megaesophagus and Chagas' disease [4], in spite of the fact that the lesion itself does not seem to contribute to the plexuses destruction. Furthermore, the allergic background to explain cardiac lesions in the chronic form of the disease in men, postulated by MAGARINOS TORRES and others [1, 2, 18, 19, 22] will find strong support, considering that the necrotizing arteritis is probably related to hypersensitivity. In man there is strong evidence suggesting that some heart lesions in chronic Chagas' disease are due to vascular disturbances [1, 2, 15, 18]. In order to see if a necrotizing arteritis plays a role in their pathogenesis, studies during the phase of the disease when blood parasites decrease and the immuno-allergic response increases, should be carried out.

RESUMO

Patologia da doença de Chagas experimental no camundongo: I. Alterações do trato digestivo, com uma referência à arterite necrosante.

No presente trabalho estuda-se a anatomia patológica das manifestações no aparelho digestivo da moléstia de Chagas experimental no camundongo. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com a amostra Y, numa dose subletal, sendo sacrificados em lotes, desde 21 dias até 170 dias a partir da inoculação. A parasitemia foi controlada periòdicamente caindo a níveis mínimos ao redor dos 60-70 dias.

Foram as seguintes as conclusões do presente estudo:

1) Foi vista uma dilatação do cólon em 20% dos camundongos. Para a reprodução de um real megacólon, possìvelmente é necessário mais tempo.

2) A necrose de gordura peritoneal, observada nas primeiras fases de doença, pode depender de uma pancreatite aguda, que é vista na moléstia de Chagas experimental.

3) A musculatura lisa do intestino mostra surtos recidivantes de miosite focal, sendo que a lesão do plexo parece ser secundária a êste processo inflamatório intersticial,

Nenhum dos animais se curou integralmente, muito embora o processo tivesse diminuído de intensidade. O número de fibras parasitadas também diminuiu, porém não houve total desaparecimento das mesmas. Aparentemente, nas fases tardias da doença, do mesmo modo que no coração do homem na fase crônica, o mecanismo alérgico é essencial para a explicação da desproporção entre a quantidade de parasitas e a intensidade do quadro inflamatório.

4) Foi encontrada arterite necrosante, afetando arteríolas da subserosa intestinal, cuja freqüência aumentou muito ao redor dos 80 dias, podendo, portanto, ser relacionada ao estabelecimento do estado imunoalérgico no animal infetado. A lesão é semelhante àquela vista na poliarterite nodosa. Foi encontrada também nas coronárias de um animal e na raiz da aorta de outro. A patogênese da lesão foi discutida amplamente. As evidências apontam para uma relação estreita entre o *Tripanosoma cruzi* ou os seus produtos, como os elementos antigênicos essenciais para desencadear a lesão, de fundo imunológico. Entretanto, é preciso prudência na interpretação da mesma, sendo necessária aguardar-se os resultados da infecção a partir de formas culturais do parasita. Arterite semelhante foi vista no homem portador de megaesôfago.

REFERENCES

1 — ANDRADE, Z. A. & ANDRADE, S. G. — A patogenia da miocardite crônica chagásica (a importância das lesões isquêmicas). Arq. brasil. Med. **45**:279-288, 1955.

2 — ANDRADE, Z. A. & ANDRADE, S. G. — A patologia da doença de Chagas (forma crônica cardíaca). Bol. Fundação Gonçalo Moniz (6):1-53, 1955.

3 — BADINEZ SEPÚLVEDA, O. — Contribución a la anatomía patológica de la enfermedad de Chagas experimental. Biologica **3**:3-52, 1945.

4 — BRITO, T. & VASCONCELOS, E. — Necrotizing arteritis in megaesophagus: histopathology of ninety-one biopsies taken from the cardia. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **1**:195-206, 1959.

5 — CHAGAS, C. — Tripanosomíase americana: forma aguda da moléstia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **8**:37-60, 1916.

6 — CHURG, J. & STRAUSS, L. — Allergic granulomatosis, allergic angiitis, and periarteritis nodosa. Am. J. Path. **27**:277-302, 1951.

7 — CLARK, E. & KAPLAN, B. I. — Endocardial, arterial and other mesenchymal alterations associated with serum disease in man. Arch. Path. **24**:458-475, 1937.

8 — COLLIER, H. O. J.; FULTON, J. D. & INNES, J. R. M. — The oedema of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and the accompanying pathological lesions. Ann. trop Med. **36**:137-150, 1942.

9 — CROWELL, B. C. — Acute form of American trypanosomiasis; notes on its pathology, with autopsy report and observations on Trypanosomiasis cruzi in animals. Am. J. trop. Med. & Hyg. **3**:425-454, 1923.

10 — DUBOS, R. J. — Bacterial and mycotic infections of man. Philadelphia, Lippincott, 1952.

11 — FONSECA, L. C. — Alguns aspectos clínico-radiológicos do intestino delgado e do cólon na acalásia. Arq. Hosp. Santa Casa São Paulo **1**:179-207, 1955.

12 — KNOWLES, H. C.; ZEEK, P. M. & BLANKENHORN, M. A. — Studies of necrotizing angiitis. IV. Periarteritis nodosa and hypersensitivity angiitis. Arch. int. Med. **92**:789-805, 1953.

13 — KOEBERLE, F. — Cardiopatia chagásica. Hospital, Rio de Janeiro **53**:311-346, 1958.

14 — KOEBERLE, F. — Megaesophagus. Gastroenterology **34**:460-466, 1958.

15 — KOEBERLE, F. — Comunicações no Congresso Internacional sôbre a doença de Chagas, Rio de Janeiro, Brasil, 5-11 julho de 1959.

16 — KOEBERLE, F. — Megacolon. J. trop. Med. & Hyg. **61**:21-24, 1958.

17 — KOEBERLE, F. — Patogenia da moléstia de Chagas. Rev. goiana Med. **3**:155-180, 1957.

18 — MAGARINOS TORRES, C. B. — Patogenia das lesões do miocárdio na doença de Chagas. Rev. goiana Med. **4**:118-134, 1958.

19 — MAGARINOS TORRES, C. B. — Sôbre a anatomia patológica da doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **36**:391-404, 1941.

20 — MAGARINOS TORRES, C. B. & TAVARES, B. M. — Miocardite no macaco Cebus após inoculações repetidas com *Schizotrypanum cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **56**:85-119, 1958.

21 — MAYER, M. & ROCHA LIMA, H. — El comportamiento del *Schizotrypanum cruzi* en

animales hoemotérmicos y artropodos. Arch. venezol. Patol. trop y Parasitol. méd. **2**: 9-49, 1954.

22 — MUNIZ, J. & PENNA DE AZEVEDO, A. — Novo conceito da patogenia da doença de Chagas (Trypanosomiasis americana). Hospital, Rio de Janeiro **32**:164-183, 1947.

23 — NIÑO, F. L. — Notas sobre a anatomia patológica de la esquizotripanosis experimental. Bol. Inst. Clin. quirúrg. **2**:123-129, 1926.

24 — PEDREIRA DE FREITAS, J. L. — Contribuição para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório. Tese — Fac. Med. Univ. São Paulo, 1947.

25 — PIZZI, T. — Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas experimental: comunicación preliminar. Biológica **3**:53-68, 1945.

26 — PIZZI, T. — Contribución al conocimiento de los mecanismos imunitários en la enfermedad de Chagas experimental de la rata. Bol. chil. Parasitol. **8**:66-72, 1953.

27 — PIZZI, T. — Localización pancreática predominante y fenómenos de esteatonecrosis en ratones experimentalmente infectados con *Trypanosoma cruzi*. Bol. chil. Parasitol. **8**:11-13, 1953.

28 — PIZZI, T. & RUBIO, D. M. — Aspectos celulares de la imunidad en la enfermedad de Chagas. Bol. chil. Parasitol. **10**:4-9, 1955.

29 — RICH, A. R. — The role of hypersensitivity in periarteritis nodosa as indicated by seven cases developing during serum sickness and sulfonamide therapy. Bull. Johns Hopkins Hosp. **71**:123-140, 1942.

30 — RICH, A. R. & GREGORY, J. E. — The experimental demonstration that periarteritis nodosa is a manifestation of hypersensitivity. Bull. Johns Hopkins Hosp. **72**: 65-88, 1943.

31 — ROCHA LIMA, H. — In Amerikanische Tripanosomenkrankheiten, ed. por Carl Mense, 3ª ed., vol. **5**:673-728, 1929.

32 — SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. — Sôbre uma cêpa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia clin. et biol. **20**:191-207, 1953.

33 — TOLEDO, P. A. & FONSECA, L. C. — Radiologia do intestino delgado na acalásia. Hospital, Rio de Janeiro **44**:317-329, 1953.

34 — VIANNA, G. — Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Carlos Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **3**: 276-294, 1911.

35 — ZEEK, P. M. — Periarteritis nodosa: A critical review. Am. J. clin. Path. **22**:777-790, 1952.

36 — ZEEK, P. M.; SMITH, C. C. & WEETER, J. C. — Studies on periarteritis nodosa. III. The differentiation between vascular lesions of periarteritis nodosa and of hypersensitivity. Am. J. Path. **24**:889-917, 1948.

Recebido para publicação em 14 janeiro 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(1):29-36, janeiro-fevereiro 1960

ALTERAÇÕES PULMONARES OBSERVADAS NO TRATAMENTO ANTIMONIAL DA ESQUISTOSSOMOSE

Aluízio Prata e Ruy Machado

RESUMO

Os autores relatam sete casos de pacientes esquistossomóticos que apresentaram lesões pulmonares, na vigência e após tratamento pelos antimoniais trivalentes. O quadro clínico dos doentes caracterizou-se por dispnéia, febre, calafrios, astenia, e estertores crepitantes ou bolhosos finos. O quadro radiológico variou em aspecto, extensão, localização e evolução, sendo as imagens pulmonares rotuladas de infiltrado tipo Löffler, nodulares, confluentes e difusas, congestão, lesão intersticial disseminada. Todos tiveram eosinofilia, variável entre 21 e 62%. O processo evoluiu benignamente. Os autores explicam as manifestações pulmonares à base da eosinofilia produzida pelos antimoniais.

INTRODUÇÃO

Os antimoniais trivalentes, em que pese a sua toxicidade, continuam a ser os medicamentos mais eficientes e mais usados no tratamento da esquistossomose. As reações por êles produzidas têm sido bem estudadas, particularmente em determinados setores do organismo como o aparelho cardiovascular e o digestivo. Conquanto sejam bem conhecidas determinadas manifestações clínicas, como a tosse, coriza e espirros, ligadas ao aparelho respiratório, há poucas referências sôbre a existência de lesões pulmonares. Estas, quando mencionadas, têm sido atribuídas a manifestações pneumônicas causadas pela morte dos vermes, sob efeito da estibioterapia.

Koppisch [6] mencionou o caso de uma jovem de 14 anos, com hepatosplenomegalia e arterite pulmonar esquistossomótica, que faleceu na vigência do tratamento com fuadina. Após a quinta injeção apresentou febre, taquicardia, taquipnéia, tosse e escarros hemoptóicos, revelando o exame físico dos pulmões, macicez e estertores finos na metade inferior do pulmão direito. Aplicadas mais três injeções tornou-se dispnéica e cianótica, vindo a falecer 12 horas após a última. A necropsia revelou: lesões de arterite pulmonar esquistossomótica; pseudo-tubérculos e vermes mortos dentro de veias, tendo em tôrno um infiltrado, composto principalmente de eosinófilos; ao redor dos vermes necrosados, alvéolos hemorrágicos e com abundantes eosinófilos, linfócitos e mononucleares; focos broncopneumônicos, com os ácinos cheios de fibrina e de leucócitos, em sua maioria eosinófilos; congestão no restante do parênquima pulmonar.

Analisando a descrição de Koppisch, vemos que algumas lesões são dependentes, diretamente, do ôvo e do verme. No entanto, outras, como as broncopneumônicas e os focos hemorrágicos, surgiram em zonas onde não parecia haver elementos esquistossomóticos. Convém, ainda, assinalar que o mencionado autor admitiu como *causa mortis* da paciente uma sensibilização a produtos de desintegração dos vermes e miracídios, na dependência da terapêutica.

Fac. Medicina da Univ. Bahia — Clín. Doenças Trop. e Infectuosas (Prof. A. Prata).
Trabalho apresentado no II Congr. Médico Regional da Bahia, Vitória da Conquista (30-10-59).

MEIRA [7] verificou a presença de lesão pulmonar em um paciente hepatosplênico submetido à terapêutica antimonial. O estudo radiológico dos pulmões, 25 dias após o início do tratamento, revelou pequenas manchas de contornos esfumados, esparsas por todo o pulmão direito, com tendência a confluir na base, além de pequenos nódulos do tamanho da cabeça de um alfinête. MEIRA atribuiu o achado à "pneumonia por verme morto", entidade mórbida, conforme mencionou, estudada por ERFAN & col. Acrescentou que o trematódeo poderia estar localizado no pulmão, antes do tratamento, e que, em outras circunstâncias, chegaria ao mesmo como um êmbolo. Admitiu, de qualquer modo, relativa benignidade ao processo.

DAO & col., segundo CHIANG & CHANG [1], descreveram nove casos de esquistossomose japônica que, na vigência ou após tratamento pelo tártaro emético, apresentaram alterações pulmonares. Aventaram os autores a hipótese de que o antimonial, nos casos em que houvesse grande deposição de ovos nos pulmões, produziria uma reação alérgica no tecido circundante dos pseudotubérculos.

Tendo encontrado alterações pulmonares em pacientes esquistossomóticos tratados pelos antimoniais trivalentes e acreditando serem as mesmas mais freqüentes do que se pensa e em face à raridade com que são mencionadas, achamos de algum interêsse relatar nossa experiência sôbre o assunto.

MATERIAL

Nosso material consta de 4 casos iniciais encontrados entre pouco menos de 1.000 pacientes tratados com diferentes antimoniais, usados em vários esquemas medicamentosos. Foram radiografados pelo fato de apresentarem sintomas evidentes de pneumopatia, na vigência do tratamento ou após o mesmo. Um outro caso (nº 5), embora sem manifestações clínicas pulmonares tão sugestivas como as anteriores, foi radiografado pela possibilidade do encontro de alterações semelhantes às acima citadas. Incluímos ainda, dois outros, do Hospital das Clínicas da

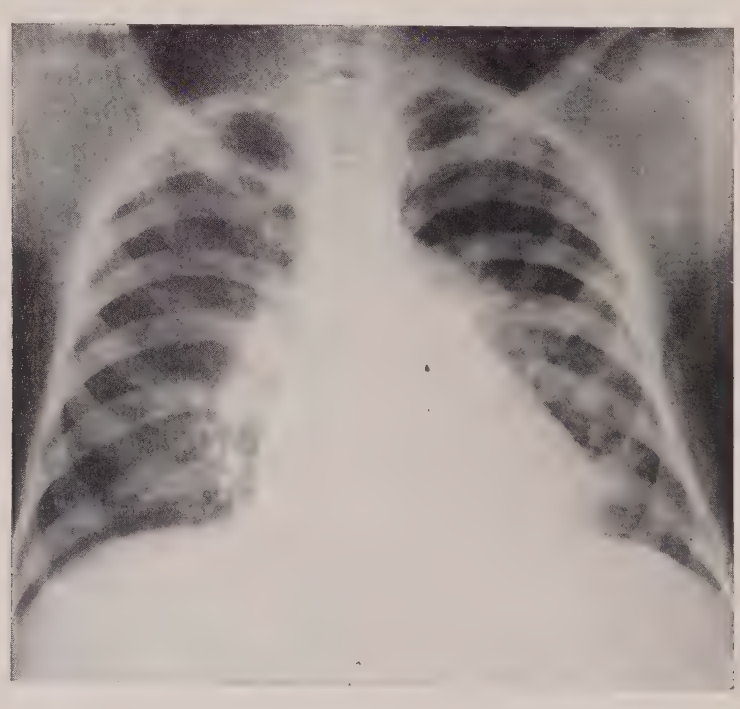


Fig. 1 (caso nº 1) — Telerradiografia de 24-9-52 — Na imagem médio-torácica nota-se elevação do arco médio (arterite pulmonar esquistossomótica?). Imagens nodulares difusas, sem contornos definidos, em ambos os campos pulmonares (aspecto broncopneumônico).

Universidade da Bahia, sendo o caso nº 7, da 2ª Clínica Médica (Prof. Roberto Santos) e o caso nº 6, da Terapêutica Clínica (Prof. Fernando S. Paulo).

CASUÍSTICA

Caso nº 1 — Hosp. Nav. do Salvador — 21 anos, masculino, melanoderma, com esquistossomose hepatosplênica. Usou antimônio pirocatecol-dissulfonato de sódio (Repodral), em dias alternados, num total de 35 ml (8 injeções). Iniciou o tratamento em 5-9-52 e terminou em 17-9-52. Apresentou 7 dias após o término do tratamento, febre, dispnéia, astenia, anorexia, tosse, coriza, hipersecreção brônquica.

Telerradiografia (24-9-52): na imagem médio-torácica nota-se elevação do arco médio (arterite pulmonar esquistossomótica?). Imagens nodulares difusas, sem contornos definidos, em ambos os campos pulmonares (aspecto broncopneumônico). 6-10-52: mesmas alterações cardiovasculares. Ainda persiste a congestão pulmonar, embora menos acentuada.

Leucogramas (7-8-52): leucócitos, 800; eosinófilos, 10%; bastões, 14%; segmentados, 46%; linfócitos, 22%; monócitos, 8%. 26-9-52: leucócitos, 1.400; eosinófilos, 21%; bastões, 14%; segmentados, 33%; linfócitos, 22%; monócitos, 9%.

Desaparecimento do quadro clínico-radiológico pulmonar sem terapêutica.

Caso nº 2 — Hosp. Nav. do Salvador — 22 anos, feminina, leucoderma, com esquistossomose hepatosplênica. Usou antimôniotiomalato de lítio (Antiomalina) em dias alternados, num total de 35 ml. Iniciou o tratamento em 3-9-54 e terminou em 20-9-54. Durante o tratamento apresentou febre, tosse, astenia e estertores crepitantes audíveis na base do pulmão direito. 13-9-54: as mesmas manifestações clínicas, já se ouvindo estertores crepitantes em ambos os campos pulmonares. 20-9-54: surgiu edema da face e persistiu a febre. Dores abdominais. Ausculta do coração e pulmão normais. 19-10-54: óbito.

Telerradiografias — 19-8-54: campos pulmonares normais. 9-9-54: infiltrados na região infraclavicular direita. 13-9-54: pulmões normais. Imagem médio-torácica mostrando alongamento do arco inferior esquerdo e proeminência do arco médio.

Fig. 2 (caso nº 2) — Telerradiografia de 9-9-54 — Infiltrados na região infraclavicular direita.

Leucogramas — 20-8-54: leucócitos, 5.600; eosinófilos, 19%; bastões, 8%; segmentados, 43%; linfócitos, 28%; monócitos, 2%. 18-8-54: leucócitos, 3.600; eosinófilos, 43%; bastões, 4%; segmentados, 34%, linfócitos, 17%; monócitos, 2%.

Desaparecimento do quadro 4 dias após, sem terapêutica.

Necroscopia (realizada pelo Dr. A. Silvany Filho): revelou fibrose hepática pós-necrótica. Havia arteriolite pulmonar necrosante, *cor pulmonale* esquistossomótico moderado. É interessante que se mencione o encontro na luz de uma das arteríolas pulmonares de um molde eosinofílico que representava um verme morto. O óbito foi atribuído a peritonite, conseqüente à transformação purulenta do líquido ascítico após paracentese.

Caso nº 3 — Hosp. Nav. do Salvador — 17 anos, masculino, meloderma, com esquistossomose hépato-intestinal. Usou gluconato trivalente de antimônio e sódio (Triostib), diàriamente, num total de 1.575 mg. Iniciou o tratamento em 4-8-58 e terminou em 11-8-58.

Tolerou regularmente a medicação embora apresentasse algumas reações comuns aos antimoniais, como febrícula, anorexia, astenia e "gripe". 13-8-58: febre de 38°C ao tempo em que os sintomas assinalados anteriormente foram aumentando de intensidade. 15-8-58: dispnéia, cefaléia, vômitos, calafrios, tosse com expectoração muco-purulenta. 21-8-58: persiste a tosse. Apirético. Dôres na face anterior do tórax. Estertores bolhosos disseminados.

Telerradiografias — 21-8-58: imagens nodulares esparsas e confluentes sem contornos definidos, em ambos os campos pulmonares, particularmente à direita. 28-8-58: reabsorção completa das imagens vistas na radiografia anterior.

Leucograma — 28-8-58: leucócitos, 1.800; eosinófilos, 27%; bastões, 4%; segmentados, 32%; linfócitos, 32%; monócitos, 5%.

Regressão do quadro clínico e radiológico sem terapêutica.

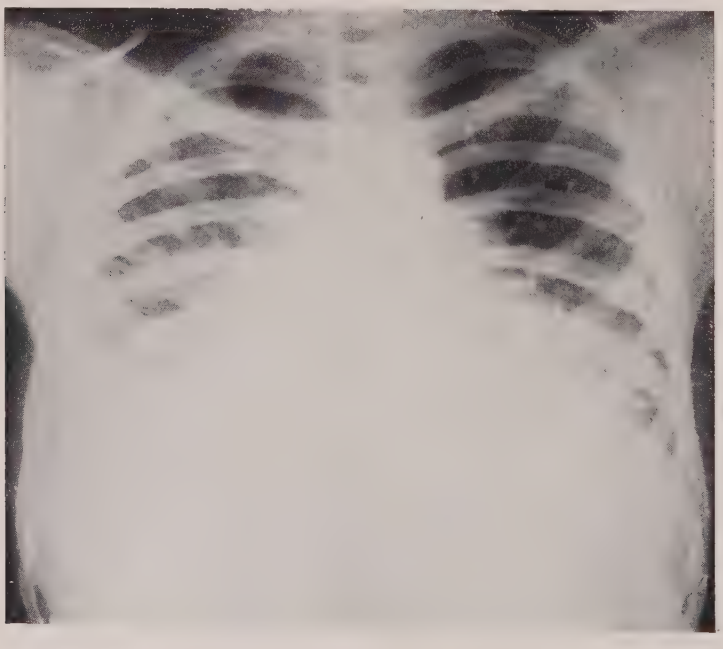


Fig. 3 (caso nº 3) — Telerradiografia de 21-8-58 — Imagens nodulares esparsas e confluentes sem contornos definidos em ambos os campos pulmonares, particularmente à direita.

Caso nº 4 — Hosp. Nav. do Salvador — 20 anos, masculino, feoderma, com esquistossomose hépato-intestinal. Usou gluconato trivalente de antimônio e sódio (Triostib) em dias alternados.

Iniciou o tratamento em 21-10-58, interrompendo-o por conta própria em 3-11-58. Nesta data apresentou febre, tosse com expectoração amarelada, vertigens, mialgias e astenia, que persistiram até o dia 10-11-58. Usou penicilina e estreptomicina sem resultado.

Caso nº 5 — Hosp. Nav. do Salvador — 20 anos, masculino, leucoderma com esquistossomose hépato-intestinal. Usou gluconato de antimônio e sódio (Triostib), em dias alternados. Iniciou o tratamento no dia 2-12-58 e terminou em 16-12-58. No curso do tratamento queixou-se de mialgias, astralgias, sudorese e apresentou desidrose. 19-12-58: tosse, cefaléia e dôres torácicas. Fêz uso de corticoteróide sem resultado aparente.

Telerradiografias — 23-12-58: sombras opacas, sem homogeneidade nem morfologia definida, na porção externa e vértice da metade superior do campo pulmonar direito, com aspecto pneumônico. Sombras fasciculadas opacas, dirigindo-se para o vértice esquerdo, com aspecto infiltrado. 29-12-58: completa reabsorção das imagens assinaladas na radiografia anterior.

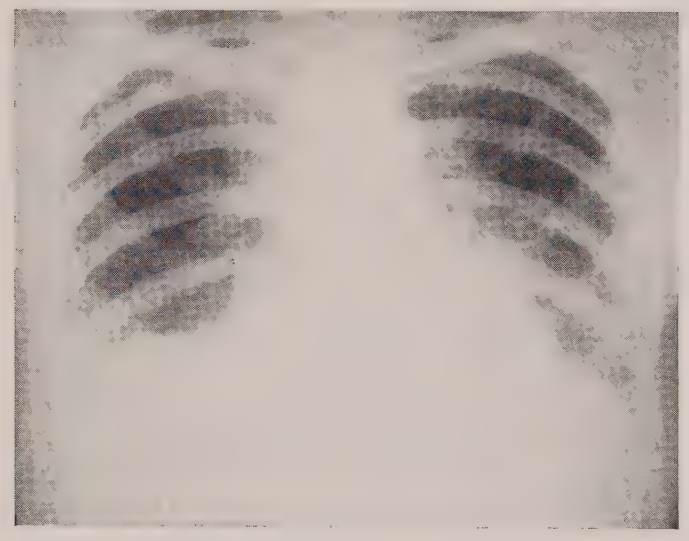


Fig. 4 (caso nº 4) — Telerradiografia de 4-11-58 — Diminuição de transparência dos campos pulmonares e alteração do retículo devido a processo intersticial.

Telerradiografias — 4-11-58: diminuição global de transparência de ambos os campos pulmonares e alteração do retículo devido a processo intersticial. 19-11-58: transparência normal de ambos os campos pulmonares.

Leucograma — 10-11-58: leucócitos, 7.100; eosinófilos, 25%; bastões, 9%; segmentados, 49%; linfócitos, 13%; monócitos, 4%. 4-11-58: leucócitos, 7.900; eosinófilos, 29%; bastões, 1%; segmentados, 47%; linfócitos, 15%; monócitos, 8%.

Pulmões normais 16 dias depois.

Leucogramas — 2-12-58: leucócitos, 6.400; eosinófilos, 24%; bastões, 6%; segmentados, 36%; linfócitos, 25%; monócitos, 9%. 29-12-58: leucócitos, 19.100; eosinófilos, 62%; bastões, 1%; segmentados, 20%; linfócitos, 14%; monócitos, 3%.

Pulmões normais 13 dias após.

Fig. 5 (caso nº 5) — Telerradiografia de 23-12-58 — Sombras opacas sem homogeneidade nem morfologia definida, na porção externa e vértice da metade superior do campo pulmonar direito, com aspecto pneumônico. Sombras fasciculadas opacas dirigindo-se para o vértice esquerdo com aspecto de infiltrado.

Caso nº 6 — Hosp. das Clín. do Salvador — 34 anos, masculino, leucoderma, com esquistossomose hépato-intestinal. Usou tártaro emético a 2% no total de 20 ampôlas. Iniciou o tratamento em 25-9-50. Uma nova série em 6-11-50 e uma terceira em 16-11-51. No dia 12-11-50 (na vigência da segunda série medicamentosa) apresentou "gripe forte", manifestações de bronquite e quadro pneumônico na base esquerda.

Telerradiografias — 17-11-50: imagens de condensação irregular e contornos difusos projetada na porção interna da base esquerda. Espessamento da trama broncovascular na vizinhança. 9-3-51: normal.

Caso nº 7 — Hosp. das Clín. do Salvador — 36 anos, feminina, leucoderma, com esquistossomose intestinal e insuficiência cardíaca. Usou antimônio-pirocatecol-dissulfonato de sódio (Repodral) no total de 5 injeções, sendo a última em 1-4-57.

Telerradiografia — 1-4-57: infiltrado pulmonar.

Leucograma — 5-4-57: leucócitos, 7.800; eosinófilos, 43%; bastões, 3%; segmentados, 41%; linfócitos, 12%; monócitos, 2%.

COMENTÁRIOS

Nos esquistossomóticos submetidos à terapêutica antimonial é comum, entre outras reações tóxicas, febre, astenia e coriza, simulando não raramente o quadro clínico de uma virose das vias aéreas superiores. Com freqüência, os doentes rotulam suas queixas de "gripe". Às vêzes, surgem ainda calafrios, dispnéia e tosse sêca ou produtiva, revelando a ausculta dos pulmões sinais de bronquite. Que tais reações medicamentosas podem repercutir no pulmão, a ponto de se exteriorizarem por imagens radiológicas, bem atestam os nossos casos ora apresentados.

O quadro clínico dos nossos pacientes caracterizou-se pela maior intensidade dos sintomas quando comparado com o habitualmente visto durante a estibioterapia. A aus-

cultação revelou em 3 dêles estertores bolhosos ou crepitantes.

O quadro radiológico não foi uniforme, variando em aspecto, extensão, localização e evolução. As imagens pulmonares foram rotuladas, pelo Dr. José Sobrinho, como infiltrado tipo Löffler, pneumonia, broncopneumonia, congestão e lesão intersticial disseminada.

Entre os exames laboratoriais chamou-nos a atenção, no leucograma, a freqüência da eosinofilia, presente em todos os 6 casos em que foi pesquisada. A percentagem variou entre 21 e 62%. Tal manifestação hematológica, comum entre os indivíduos submetidos à antimonioterapia, atingindo mesmo cifras elevadas, foi constante e de certa intensidade em nossos pacientes.

Cremos não estarem as lesões pulmonares na dependência de um determinado antimonial trivalente, desde quando surgiram com tártaro emético, Repodral, Antiomalina e Triostib. Ademais, não guardaram relação com a dose do medicamento administrado, surgindo tanto na vigência como após o tratamento.

A evolução foi variável, entre 4 e 16 dias, nos casos em que pudemos fazer contrôle radiográfico. O processo tem curso benigno, evoluindo espontâneamente para a cura, mesmo sem medicação. Sòmente um paciente (caso nº 2) veio a falecer, não na dependência direta da lesão que apresentava, a qual desapareceu um mês antes do óbito. A penicilina e a estreptomicina não influenciaram a evolução do quadro clínico e radiológico de um dos pacientes (caso nº 4). Do mesmo modo não podemos atribuir algum efeito terapêutico ao corticosteróide administrado numa ocasião (caso nº 5).

Evidentemente, a patogenia das alterações pulmonares está na dependência direta ou indireta do antimonial. Sabe-se que os vermes mortos podem provocar, ao seu derredor, extensa área de necrose e infiltração [2, 5 e 6], fato êste em que se baseiam Bezerra Coutinho, Barros Coelho, Tavares, Menezes, e outros, para fazer sérias restrições ao emprêgo terapêutico dos antimoniais na esquistossomose. É evidente que, ocorrendo a morte do verme no pulmão, a reação provocada pode exteriorizar-se radiològicamente, como mostrou, entre outros, Meira [7].

Devemos convir, porém, que as lesões pulmonares nem sempre se apresentam nas vizinhanças dos vermes em desintegração, podendo localizar-se em tôrno de ovos, ou em zonas onde não parece haver elementos esquistossomóticos, como mostrou Koppisch [6]. Daí concluir êste autor que as mesmas estariam na dependência de sensibilização causada pela desintegração do verme e miracídio. Também, por mecanismo alérgico, Dao & col., segundo Chiang & Chang [1], explicam as lesões pulmonares dos seus pacientes tratados pelo tártaro emético.

É possível que em alguns dos nossos casos tenha havido uma "pneumonia por verme morto". Todavia, a fugacidade e a disseminação com que as lesões às vêzes se apresentaram sugerem a possibilidade de outro mecanismo patogênico em causa. Ademais, vários dos nossos pacientes não pareciam apresentar uma localização pulmonar da doença, pelo menos capaz de justificar a intensidade das alterações radiológicas observadas com o tratamento.

Pensamos que os trabalhos de Vaughn [8] e de Epstein & Kligman [4] nos forneçam elementos para interpretação mais judiciosa das lesões pulmonares que constituem objeto do presente trabalho.

Vaughn [8] examinando cobaias com eosinofilia natural ou provocada por extratos de *Ascaris* ou histamina, verificou que os pulmões seqüestravam os eosinófilos, apresentando zonas de consolidação, congestão, atelectasia e eosinófilos nas proximidades dos brônquios e vasos sanguíneos. Comentando seus resultados acentuou o autor que o mesmo fato poderia suceder no homem, o que explicaria certos quadros pulmonares eosinofílicos.

Epstein & Kligman [4] injetando solução a 10% de 3-pentadecilcatecol, em óleo de sésamo, em mais de 1.000 indivíduos, verificou a existência de pneumonite eosinofílica em 7 dêles, cujo quadro clínico caracterizou-se, principalmente, por febre, tosse, dispnéia, mal-estar e eosinofilia sanguínea. Os infiltrados pulmonares vistos radiològicamente não dependeram de reação alérgica, desaparecendo entre 4 e 15 dias.

Achamos que a maioria dos nossos casos possa ser explicada por mecanismo semelhante. O fato mais importante seria a presença de eosinofilia em todos. É sabido que os antimoniais produzem tal alteração, mesmo administrados a indivíduos não esquistossomóticos, sendo pois de se supor que as lesões pulmonares possam ter origem independente da doença para a qual são administrados. Aliás, êsse também é o pensamento de GOODMAN & GILMAN [5] quando afirmam que os antimoniais trivalentes podem causar a pneumonia, não sendo a mesma uma complicação da doença tratada. É evidente que, em se tratando de esquistossomóticos, teremos mais um fator a concorrer no aumento de eosinófilos. Desconhecemos, no entanto, as razões porque uns indivíduos com eosinofilia mostram manifestações pulmonares, enquanto outros, nas mesmas condições, não as apresentam.

Tendo em vista ainda o quadro clínico exibido, uma outra hipótese, embora remota, seria a de se atribuir as manifestações pulmonares a uma virose das vias aéreas superiores.

SUMMARY

Pulmonary changes occurring with the antimonium therapy of schistosomiasis.

Pulmonary changes occurring during and after antimonium therapy for Manson Schistosomiasis are reported in seven cases. The clinical picture was characterized by dyspnea, fever chills, asthenia and rales. X-rays showed changes which varied in aspect, extension, localization, being labeled as Löffler's infiltrate, nodular or diffuse changes, congestion and disseminated interstitial lesions. Eosinophilia ranging from 21 to 62% was present in all patients. Evolution had a benign character. Eosinophilia produced by antimonium was the explanation suggested by the authors for the changes observed.

REFERÊNCIAS

1 — CHIANG, S.-T. & CHANG, K.-C. — Schistosomiasis japonica: radiological pulmonary manifestations in 47 cases. Chinese med. J. **76**:24-39, 1958.

2 — COUTINHO, A. B. — Objeções à prática do chamado "tratamento específico" da esquistossomose mansoni. *In* Esquistossomose mansoni no Brasil. São Paulo, Sociedade de Gastrenterologia e Nutrição, 1953.

3 — DIAS, C. B. — Quimioterapia antimonial na esquistossomose mansônica. Rev. S.E.S.P. **4**: 1-351, 1950.

4 — EPSTEIN, W. L. & KLIGMAN, A. M. — Pathogenesis of eosinophilic pneumonitis (Löffler's syndrome). J.A.M.A. **162**:95-97, 1956.

5 — GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. — The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, Macmillan, 1958.

6 — KOPPISCH, E. — Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. Puerto Rico J. publ. Health and trop. Med. **16**:395-455, 1940.

7 — MEIRA, J. A. — Esquistosomíase mansoni hépato-esplênica. Tese. São Paulo, 1951.

8 — VAUGHN, J. — The function of the eosinophile leukocyte. Blood **8**:1-15, 1953.

Recebido para publicação em 22 dezembro 1959.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(1):37-40, janeiro-fevereiro 1960

CONTROL OF VOMITING DUE TO DITHIAZANINE, AN ANTIPARASITIC DRUG

Francisco Biagi-F., Oscar Pinzón and Alfonso Martuscelli-Q.

SUMMARY

Three special dithiazanine preparations were compared by the "double blind" method, including also the preparation available at present on the market.

It was found that the four preparations were equally effective against each of the five intestinal parasitoses studied, but that one of the special preparations was very well tolerated by the patients, not causing vomiting at any time in the 133 patients treated.

INTRODUCTION

The effectiveness of dithiazanine against various parasitoses has been reported recently. In a previous paper [2] we gave the bibliographical references that had appeared on the subject and other simultaneous or subsequent publications [1, 4, 5, 6] have corroborated the initial observations.

Unfortunately, this drug used to cause vomiting rather frequently as the most severe manifestation of intolerance. In a total of 304 treatments, there was vomiting in 33 persons, or 10.9% [2, 4], thus limiting the use of the drug.

It was thought that with certain coatings that would retard the dissolution of the tablets the frequency of the vomiting would be decreased; however, it would be necessary to demonstrate in an objetive manner: (a) that vomiting would decrease in frequency and (b) that the drug would maintain its effectiveness against the parasitoses.

MATERIAL AND METHODS

Four dithiazanine* preparations of identical appearance and designated A, B, C, and D, were used. Tablets A had multiple coatings of methylcellulose; tablets B had multiple coatings of polyvinyl-pyrrolidone; and tablets C had several coatings of methylcellulose but with a special granulation. The disintegration time of these tablets varied between 60 and 45 minutes in the Stowl-Bershberg (Vanderkamp, U.S.P.) apparatus. Tablets D were identical to the tablets now available on the market.

Treatments were administered at the rate of 10 mg per kg. of body weight per day (without exceeding 600 mg.) for 5 days. The "double blind" method was used to avoid false results.

Prior to treatment three egg counts in feces were made, figuring the average egg count per gram of feces for each parasite. Eight days after the end of the treatment the study was repeated in the same manner and the percentage of the drop in the egg count was figured. Considering persons having a reduction of 70% in the egg count as really benefitted by the drug, its effectiveness was compared according to the frequency with which a 70-100% reduction in the egg count was obtained in the various groups of persons treated.

Pathology Unit, School of Medicine, U.N.A.M., Hospital General — México 7, D.F., México.

* Partel (Lilly).

TABLE I

Age and number of persons treated with various dithiazanine preparations, the control of which was completed.

Dithiazanine	*Number of cases treated*	*Age Groups*			
		Infants	*Pre-school age*	*School age*	*Adults*
A	106	—	9	72	25
B	79	1	6	56	16
C	62	—	6	38	18
D	71	—	7	53	11
Total	318	1	28	219	70

The FERREIRA 1:10 method was used because it is a quantitative concentration method, useful for egg counts and exceptionally offering negative results if there are eggs in the feces, even in very scarce numbers [3].

The control of 318 treatments (one treatment per case) was finished. Table I gives the data relative to the age of the persons treated and the number of treatments corresponding to each preparation. Actually, more treatments were given, but the patients did not deliver their control samples; a higher number of cases were questioned as to intolerance phenomena.

RESULTS AND COMMENTS

An analysis of the incidence of vomiting is shown in table II. Preparation D continued to cause vomiting with great frequency. By applying tests of statistical significance it was demonstrated that forms A, B, and C caused vomiting with much less frequency and that preparation A caused vomiting with less frequency than B and C ($P<0.05$).

TABLE II

Frequency of vomiting in cases treated with various dithiazanine preparations.

Dithiazanine	*No. of cases treated*	*Vomiting*	
		No. of cases	*%*
A	133	—	—
B	103	3	2.9
C	88	2	2.3
D	76	8	10.5

Other intolerance phenomena are shown in table III. As can be seen, what happened with the vomiting also happened with all the other intolerance phenomena, and preparation A was the best tolerated, since it only produced disorders of little importance.

TABLE III

General table of intolerance phenomena in cases treated with various dithiazanine preparations. The percentage of frequency is given.

Dithiazanine	*No. of cases*	*% with intolerance phenomena*				*% without disorders*
		Vomiting	*Nausea*	*Dizziness*	*Abdominal pain*	
A	133	—	0.7	9.8	11.3	79.7
B	103	2.9	5.8	9.7	16.5	69.9
C	88	2.3	6.8	12.5	17.0	73.8
D	76	10.5	21.1	23.7	36.8	55.2

TABLE IV

Effectiveness of various dithiazanine preparations in cases of hymenolepiasis. Cases with a reduction of over 70% in egg count per gram of feces (70-100% ↓) are tabulated.

Dithiazanine	*No. of treatments*	*Cases with a reduction over 70% in egg count*	
		No.	*%*
A	25	11	44.0
B	20	8	40.0
C	20	13	65.0
D	24	12	50.0

Differences statistically not significant.

An analysis of the effectiveness of the different preparations against five intestinal helminthiases is presented in tables IV to VIII. Tests of statistical significance (χ^2) were applied and it was found that the four preparations had practically the same effectiveness against each parasitosis. It is especially interesting to note that the coatings that retarded the dissolution of the tablets did not decrease the effectiveness of the drug against the parasites localized in the duodenum (hookworm and *Strongyloides*).

TABLE V

Effectiveness of various dithiazanine preparations in cases of ascariasis. Cases with a reduction of over 70% in egg count per gram of feces (70-100% ↓) are tabulated.

Dithiazanine	*No. of treatments*	*Cases with a reduction of over 70% in egg count*	
		No.	*%*
A	93	45	48.4
B	67	36	53.7
C	57	26	45.6
D	59	33	55.9

Differences statistically not significant.

TABLE VI

Effectiveness of various dithiazanine preparations in cases of trichocephaliasis. Cases with reduction of over 70% in egg count per gram of feces (70-100% ↓) are tabulated.

Dithiazanine	*No. of treatments*	*Cases with a reduction of over 70% in egg count*	
		No.	*%*
A	64	39	60.9
B	45	24	53.4
C	32	14	43.7
D	47	29	61.7

Differences statistically not significant.

TABLE VII

Effectiveness of various dithiazanine preparations in cases of hookworm infection. Cases with a reduction of over 70% in egg count per gram of feces (70-100% ↓) are tabulated.

Dithiazanine	*No. of treatments*	*Cases with a reduction of over 70% in egg count*	
		No.	*%*
A	35	14	40.4
B	21	12	57.1
C	16	9	56.3
D	20	10	50.0

Differences statistically not significant.

TABLE VIII

Effectiveness of various dithiazanine preparations in cases of strongyloidiasis. Cases with a reduction of over 70% in larvae count per gram of feces (70-100% ↓) are tabulated.

Dithiazanine	*No. of treatments*	*Cases with a reduction of over 70% in larvae count*
A	5	5
B	5	5
C	1	1
D	7	6

BIAGI-F., F.; PINZÓN, O. & MARTUSCELLI-Q., A. — Control of vomiting due to dithiazanine, an antiparasitic drug. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:37-40, 1960.

The lesser effectiveness of dithiazanine found by us (if our figures are compared with those of other authors) is due to the FERREIRA method, which shows the eggs even when they remain in a very scarce quantity after the treatment.

RESUMO

Contrôle do vômito devido à ditiazanina, uma droga antiparasitária.

Três preparados especiais de ditiazanina foram comparados, pelo "*double blind* método", com um preparado atualmente existente no mercado.

Chegou-se à conclusão de que os quatro preparados eram igualmente eficientes contra tôdas as cinco parasitoses estudadas. Entretanto, apenas um dos preparados especiais, com revestimentos múltiplos de metilcelulose, era bem tolerado, não causando vômitos em nenhuma ocasião aos 133 pacientes tratados por êle.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Dr. J. Gabriel Evans for his enthusiasm and cooperation in connection with this work.

REFERENCES

1 — AMARAL, A. D.; PIRES, C. D.; AMATO NETO, V.; FERREIRA, C. S. & FERREIRA, J. M. — Observações sôbre a atividade anti-helmíntica da ditiazanina. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **1**:41-56, 1959.

2 — BIAGI F., F.; GÓMEZ-OROZCO, L. & ROBLEDO, E. — Ensayo sobre la ditiazanina como droga antiparasitaria. Bol. Med. Hosp. Inf. Méx. **16**:17-22, 1959.

3 — BIAGI F., F. & GONZALEZ, C. — Estudio de métodos para el recuento de huevos en materia fecal. Rev. latinoamer. Microbiol. **2**:51-62, 1959.

4 — MEJÍA, R. & BIAGI F., F. — El ioduro de ditiazanina en algunas helmintiasis. Medicina, México **39**:346-348, 1959.

5 — WAGNER, E. D.; LEMON, F. R. & BURNETT, H. S. — The use of dithiazanine in the treatment of helminthiasis in Mexican farm laborers. Am. J. trop. Med. Hyg. **7**:600-602, 1958.

6 — YOUNG, M. D.; JEFFERY, G. M.; FREED, J. E. & MOREHOUSE, W. G. — Effectiveness of dithiazanine against worm infections of mental patients. Arch. Neurol. a. Psychiat. **80**:785-787, 1958.

Recebido para publicação em 10 janeiro 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(1):41-53, janeiro-fereveiro 1960.

ESTUDOS SÔBRE A REAÇÃO DA PRECIPITINA APLICADA À IDENTIFICAÇÃO DE SANGUE INGERIDO POR TRIATOMÍNEOS

Astolpho Ferraz de Siqueira [1]

RESUMO

A reação da precipitina, executada em tubos de vidro de pequeno calibre, foi estudada com o fim de ser aplicada na identificação de sangue ingerido por triatomíneos.

Foram usados tubos com 40 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno. Os tubos, tendo recebido o sôro precipitante por capilaridade, eram fixados em suportes apropriados e recebiam o antígeno, adicionado cuidadosamente por meio de uma pipeta de Pasteur com extremidade muito afilada. Os resultados eram registrados após 2 horas de incubação em temperatura ambiente.

Os soros precipitantes foram preparados em coelhos por injeções intramusculares de sôro prèviamente precipitado por alúmen de potássio, sôro êste proveniente de vários animais. Antes do uso os soros precipitantes foram absorvidos com antígenos heterólogos a fim de melhorar a sua especificidade.

O teste da precipitina foi aplicado ao conteúdo intestinal de triatomíneos que haviam sugado prèviamente em um animal ou em animais de espécies diferentes e mantidos no laboratório por vários meses. O teste foi também aplicado em triatomíneos que, sacrificados logo após a refeição sanguínea, foram conservados no laboratório por vários meses.

A técnica é fàcilmente executada com pequenas quantidades dos reagentes e as leituras foram satisfatórias.

"Barbeiros" que sugaram em uma espécie de animal e que ingeriram de 150 a 350 mg de sangue deram reações positivas 120 dias após a refeição. "Barbeiros" que sugaram em duas espécies de animais deram resultados positivos quando soros precipitantes correspondentes foram usados, permitindo a identificação do sangue das duas espécies envolvidas.

"Barbeiros" sacrificados e preservados secos em temperatura ambiente permitiram reações positivas até 3 meses depois da refeição.

INTRODUÇÃO

A identificação de sangue ingerido por triatomíneos, além de ser importante como dado epidemiológico, é método que poderá vir a constituir auxiliar valioso para a procura de focos de reinfestação em localidade onde se tenha conseguido a erradicação de "barbeiros" domiciliares. Julgamos portanto de grande atualidade o estudo e a padronização de uma técnica que se adapte às condições dos hematófagos referidos.

Fac. Med. Ribeirão Prêto, da Univ. de São Paulo — Dep. Parasitol. (Prof. M. P. Barretto).
[1] Assistente.

Nota — Os dados dêste trabalho constituíram parte da tese de doutoramento defendida pelo autor em 1958.

SIQUEIRA, A. F. de — Estudos sôbre a reação da precipitina aplicada à identificação de sangue ingerido por triatomíneos. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:41-53, 1960.

A reação da precipitina, de longa data usada na identificação de sangue para vários fins, tem sido também empregada no reconhecimento de sangue ingerido por numerosos artrópodes. Usada por ROMAÑA [13] e mais tarde por CORRÊA & AGUIAR [4], mostrou-se útil na identificação de sangue ingerido por triatomíneos. WEITZ [18], aponta-a como superior às demais técnicas usadas desde que uma relativa especificidade seja conseguida à custa de soros precipitantes prèviamente absorvidos.

No presente trabalho estudaremos o comportamento da reação de precipitação quando aplicada na identificação do conteúdo intestinal de triatomíneos alimentados e mantidos em laboratório. As condições normais do material à nossa disposição e peculiaridades inerentes ao caso especial ditaram algumas adaptações por nós introduzidas na execução da reação. A preparação e estandartização dos soros precipitantes foram feitas segundo o método usado por WEITZ [16]. Na aplicação do método abordamos aspectos que julgamos mais importantes e exeqüíveis dentro das nossas possibilidades.

Êste trabalho consta de três partes: 1.°) estudo e padronização da reação; 2.°) preparação dos soros precipitantes; 3.°) aplicação da técnica a triatomíneos alimentados e conservados em laboratório.

PARTE I — ESTUDO E ADAPTAÇÃO DA REAÇÃO

A reação da precipitina manifesta-se por uma precipitação quando o sôro precipitante e o antígeno homólogo são misturados em proporções adequadas. Quando o antígeno é pôsto sôbre o sôro, formando uma superfície nítida de separação, a reação se torna mais visível e se manifesta em ampla zona de concentrações dos reagentes. Assim executada é conhecida como técnica interfacial.

1. MATERIAL E MÉTODOS

A. *Tubos de reação* — Usamos, com 2 mm de diâmetro e 40 mm de comprimento, cortados de varas de vidro "Pirex" ("code" 234040), de calibre uniforme em tôda a extensão. Antes do uso, os tubos foram colocados por 24 horas em mistura sulfocrômica, lavados em água de torneira e em água destilada e secados. Repetindo-se a operação de limpeza, foram usados numerosas vêzes.

B. *Pipetas* — Foram usadas pipetas de Pasteur estiradas no laboratório. No preparo delas, tínhamos o cuidado de fazer com que a extremidade afilada tivesse um calibre muito reduzido. As varas de vidro empregadas na confecção das pipetas, depois de cortadas eram colocadas na mistura sulfocrômica por 24 horas; depois de lavadas eram estiradas e usadas uma única vez. Assim procedemos porque a lavagem das pipetas é muito difícil.

C. *Suportes dos tubos* — Empregamos suportes de madeira (25 cm × 2 cm × 1 cm) com 15 perfurações na face superior (6 mm de diâmetro), obstruídas com massa de modelagem.

D. *Aparelho de leitura* — Improvisado no laboratório, consta de um quebra-luz fluorescente, com fundo escuro e uma lupa.

E. *Sôro precipitante* — Sôro de coelho imunizado por injeções intramusculares de sôro de galinha.

F. *Antígeno* — Sôro de galinha.

G. *Técnica da reação* — O teste depende da ação entre o antígeno e o sôro-imune correspondente. Por causa da maior densidade do sôro, apenas uma pequena difusão dos líquidos ocorre na zona de contato e o precipitado que se forma nesta região aparece como um anel branco. A reação positiva é indicada pelo aparecimento dêste anel. É importante na execução da reação que se evite a mistura dos reagentes ao introduzí-los no tubo. O sôro precipitante, introduzido por capilaridade nos tubos adequados, atinge a altura de mais ou menos 8 mm que corresponde a um volume aproximado de 25 mm^3. Fixado na massa de modelagem do suporte pela extremidade que contém o sôro, recebe em seguida o antígeno que é adicionado com o auxílio das pipetas; a ponta da pipeta pode chegar à altura do sôro ou então pode-se deixar escorrer o líquido pela parede do tubo. O volume de antígeno adicionado é mais ou menos o do sôro. A lei-

tura da reação é feita através de uma lente, contra fundo escuro, no aparelho já referido. As reações foram feitas em temperatura ambiente e os contrôles eram feitos com o sôro precipitante e solução fisiológica.

2. RESULTADOS E CONCLUSÕES

A técnica, como executada, permitiu-nos trabalhar com volume reduzido de reagentes; o manuseio dos apetrechos pareceu-nos relativamente simples e os precipitados perfeitamente visíveis.

O uso de tubos com diâmetro interno menor que 2 mm não nos permitiram leituras satisfatórias. Assim, tubos com 1,5 mm de diâmetro interno, usados por ARNOLD & col.[2] e que permitiram resultados paralelos com reações executadas em tubos de grande calibre, em nossas mãos não se mostraram adequados; menos satisfatórios ainda os tubos com diâmetro externo variando entre 1,2 e 1,5 mm preconizados por SCHUBERT & HOLDEMAN [14].

A adição dos reagentes, do modo como foi feita, teve, a nosso ver, algumas vantagens; além de fácil, corrigiu alguns defeitos por nós verificados nas técnicas usadas por alguns autores. Assim, por exemplo, ARNOLD & col.[2], SCHUBERT & KELLEY [15] e WEITZ [17], com a preocupação de executar com rapidez vários testes simultâneos, aproveitam o efeito da capilaridade para a captação do antígeno e do sôro. Parece-nos que tubos contendo antígeno, ao serem colocados em contato, pelas aberturas inferiores, com o sôro a ser usado na reação, condicionam a sua contaminação. Por outro lado, verificamos que a passagem do antígeno molha a parede interna dos tubos e, em conseqüência, quando empurrado pelo sôro precipitante não forma com êste uma superfície nítida de separação. Usando a pipeta para a introdução do antígeno, o escorrimento do líquido pela parede do tubo serve como prova de limpeza do mesmo; em tubos mal lavados e engordurados é pràticamente impossível fazer escorrer a solução do antígeno.

A leitura da reação com duas horas de incubação, segundo WEITZ [18], foi bastante satisfatória em nossa experiência; nunca nos aconteceu verificar o aparecimento de precipitado se já não tivesse aparecido neste período de observação. Algumas vêzes, reações nìtidamente positivas na primeira hora, pela lenta difusão do anel de precipitado, deixavam dúvidas em leituras subseqüentes; por isto, adotando o tempo de duas horas para a leitura definitiva, líamos também várias vêzes no decorrer dêste tempo. A verificação das reações depois de 24 horas mostrava-nos, quase sempre, um pequeno depósito de precipitado no fundo dos tubos; pretendendo uma confirmação das leituras pela presença dêstes depósitos verificamos que, às vêzes, reações nìtidamente positivas nas duas primeiras horas deixavam de apresentar os depósitos referidos.

Em conclusão, a técnica, com os detalhes referidos, satisfez os requisitos necessários à precisão dos resultados e à poupança do material a usar. Com referência à rapidez do método, reconhecemos impossível atingir o rendimento conseguido por vários autores e principalmente aquêle referido por WEITZ [17], que conseguiu provar 200 espécimes contra 6 soros precipitantes em uma única manhã. Em geral, neste tempo conseguimos examinar apenas 20 espécimes contra 15 soros, o que representa um rendimento quatro vêzes menor que o do autor citado.

PARTE II — PREPARAÇÃO DOS SOROS PRECIPITANTES

Segundo PROOM [11], a imunização de coelhos com injeções endovenosas ou intraperitoneais é mal tolerada pelos animais e dá, como resultado, soros precipitantes de baixos títulos. WOLFE [21] e PROOM [11], chamam a atenção para o fato de que a especificidade decresce com o número de injeções e para contornar êste óbice, WEITZ [16] fêz a absorção dos soros precipitantes com antígenos heterólogos; entretanto, em se tratando de animais de espécies zoològicamente próximas, o uso de soros assim absorvidos não permitiu a identificação. Baseado na experiência de UHLENHUTH (apud 16), WEITZ [16] tentou a obtenção de soros mais específicos pela imunização de um animal com o sôro do outro zoològicamente próximo. Pelas suas conclusões, a alta especificidade só foi conseguida em alguns casos, mas os soros precipitantes obtidos apresentaram títulos muito baixos.

SIQUEIRA, A. F. de — Estudos sôbre a reação da precipitina aplicada à identificação de sangue ingerido por triatomíneos. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:41-53, 1960.

Em nosso trabalho, imunizamos coelhos pelo método de PROOM [11] e absorvemos os soros precipitantes pela técnica usada por WEITZ [16].

1. MATERIAL E MÉTODOS

A. *Antígenos* — Os antígenos usados foram os soros dos seguintes animais: homem, porco, boi, cabra, cão, gato, cavalo, tatu (*Dasypus novencinctus* e *Euphractus sexinctus*), gambá (*Didelphis marsupialis aurita* e *D. surita paraguayensis*), rato (*Rattus norvergicus albinus*), morcêgo (*Eumops perotis perotis*), lagarto (*Ameiva ameiva*), galinha, pombo e pardal.

Os animais foram sangrados na veia ou no coração e o sangue foi deixado em temperatura ambiente para coagulação e separação do sôro. Êste foi distribuído em ampôlas de 5 ml e 1 ml que depois de fechadas foram guardadas em estado congelado. Para a inoculação dos coelhos o antígeno foi descongelado e tratado da maneira seguinte: num balão de 250 ml diluíamos 5 ml de sôro com 16 ml de água destilada e adicionávamos 18 ml de uma solução a 10% de alúmen de potássio ($AlK(SO_4)_2.12H_2O$) em água destilada; ajustado o pH 6,5 com solução 5N de NaOH, centrifugávamos a mistura em tubos de 45 ml e lavávamos o precipitado por duas vêzes em solução fisiológica mertiolatada (1:10.000). O precipitado final, homogenizado em 20 ml da solução mertiolatada, era usado para as inoculações.

B. *Método de imunização* — Coelhos adultos com mais de dois quilos foram usados para a imunização. Para cada antígeno foram usados dois animais que receberam injeções de 5 ml em cada perna traseira. Todos os coelhos receberam 5 inoculações espaçadas de 12 dias. A colheita do sangue foi feita por sangrias totais, puncionando o coração com o máximo de cuidado para evitar a contaminação do sangue. Após a coagulação dêste, o sôro foi removido, centrifugado e guardado em geladeira até que fôssem feitas as dosagens e absorções.

C. *Dosagem dos soros precipitantes* — Vários autores, entre êles SCHUBERT & KELLEY [14], dosam os soros precipitantes fazendo-os reagir em diluições crescentes com uma diluição fixa do antígeno; outros, como ARNOLD & col.[2], diluem tanto o sôro como o sôro como o antígeno. Como pretendemos, de acôrdo com CRUZ [5], usar o sôro precipitante no estado não diluído, na determinação do título do mesmo fizemo-lo reagir sem diluição contra diluições crescentes, em progressão geométrica de razão 2, dos antígenos homólogos. O título foi definido pelo inverso da diluição do antígeno que provocou formação de precipitado após duas horas de incubação em temperatura ambiente.

D. *Determinação da especificidade* — Autores que usam soros precipitantes não específicos e se preocupam com o problema das reações cruzadas, como, por exemplo, CARROL & KING [3] e SCHUBERT & KELLEY [15], procuram eliminá-las à custa da diluição do antígeno em identificação ou diluindo tanto antígeno como o sôro precipitante. Autores que empregam soros precipitantes prèviamente absorvidos definem a especificidade pela diluição do antígeno heterólogo que não reage em presença do sôro não diluído. WEITZ [16], por exemplo, considera específico os soros que não provocam reação quando postos em contato com antígenos heterólogos diluídos até 1:10; lembra, ainda, que na determinação do título, o tempo e temperatura de incubação devem ser os mesmos que os obedecidos na aplicação do método.

Para conhecer o grau de especificidade dos nossos soros precipitantes, fizemo-los reagir não diluídos com diluições crescentes dos antígenos heterólogos, por duas horas em temperatura ambiente.

E. *Absorção dos anticorpos não específicos* — O teor de antígenos necessário para a absorção do anticorpo correspondente é calculado por WEITZ [16] efetuando absorções preliminares em amostras dos soros. Verificada a menor quantidade de cada antígeno que provoca a absorção completa de cada sôro, é feita uma mistura em proporções corretas, dos antígenos heterólogos, para ser adicionada ao volume total do sôro precipitante em preparação. Os resultados do autor mostram que a absorção completa pode ser conseguida até com a têrça parte do volume da mistura. Em sua opinião, êste fato indica que os sangues dos animais contêm

antígenos comuns que agem simultâneamente contra vários anticorpos. Baseado nestes resultados, WEITZ [16] aconselha que se faça, na prática, a adição de uma parte da mistura de antígenos heterólogos com 100 partes do sôro precipitante, e que se refaça a absorção dos anticorpos remanescentes com antígenos correspondentes, obedecendo a proporção de 1:1.000.

Amparados na experiência dêste autor, preferimos fazer a absorção dos soros precipitantes adicionando uma parte da mistura de antígenos heterólogos a 100 partes de sôro a ser absorvido. Adicionado o antígeno, incubávamos o sôro por duas horas a 37°C e o deixávamos por 12 horas a 4°C; depois de centrifugado, o sobrenadante era provado com os antígenos usados na absorção, diluídos a 1:10. Aquêles que ainda provocassem reação eram adicionados novamente na proporção de 1:1.000 e o sôro sofria o tratamento acima descrito. Repetindo os testes com êstes antígenos, fazíamos ainda uma última absorção no caso de alguns dêles continuarem a reagir.

F. *Conservação dos soros precipitantes* — WEITZ [16] contraindica a adição dos preservativos usuais para a conservação dos precipitantes porque a turvação que se desenvolve em conseqüência dêles dificulta a leitura das reações. O autor não aconselha também o método preconizado por RICE & BARBER [12], em que o sôro é diluído em glicerina fenolada, porque além de o sôro ter o seu título diminuído pela diluição, esta impede a separação nítida entre o sôro e o antígeno no tubo de reação. Na opinião do autor citado é satisfatório o congelamento do sôro a −10°C; o ideal seria, no entanto, a secagem do sôro no estado congelado. Êste processo obrigaria a extração prévia de lipóides que poderia ser feita pelo método de MAC FARLANE [10].

Como o nosso intuito é o de padronizar uma técnica de maior simplicidade possível, julgamos oportuno estudar o comportamento do sôro precipitante conservado no congelador a −18°C. Por isto os nossos soros, desde que dosados e absorvidos, foram filtrados em placas esterilizantes (Seitz EK), repartidos em alíquotas de 1 ml, ampolados e colocados no congelador.

2. RESULTADOS E CONCLUSÕES

A. *Títulos dos soros precipitantes* — Os resultados das dosagens dos 15 soros precipitantes com os antígenos homólogos e heterólogos estão resumidos no quadro I.

Com exceção dos soros anticabra, antipombo e antipardal, com títulos homólogos próximos de 10.000, os demais se apresentaram com títulos que variaram entre 20.000 e 40.000. Reações inespecíficas ocorreram com a maioria dos soros preparados. Em alguns casos, como nos soros antiboi, anticabra e antigato, os títulos homólogos foram iguais aos obtidos com os antígenos heterólogos de cabra, boi e cão respectivamente. Os soros antigambá e antimorcêgo não reagiram com os antígenos provenientes dos demais mamíferos experimentados. O sôro antilagarto mostrou-se específico com relação aos antígenos experimentados. Os soros antiaves não reagiram com os antígenos dos demais animais mas reagiram entre si.

Os soros precipitantes obtidos por WEITZ [16] apresentaram-se com títulos mais altos que os nossos mas as reações inespecíficas dos seus soros são proporcionalmente muito mais intensas que as dos nossos. Como, na opinião do mesmo autor (WEITZ [18]), os soros precipitantes com títulos homólogos próximos de 20.000 são suficientes, não julgamos necessário e talvez nem mesmo conveniente, prosseguir nas inoculações com o fim de obter soros com títulos mais altos. A maioria dos autores emprega soros precipitantes com títulos mais baixos que os dos nossos, e mesmo alguns daqueles que seguiram o método de imunização por nós usado, como por exemplo DOWNE & MORRISON [6], acham eficientes soros de títulos homólogos próximos de 5.000.

B. *Comportamento dos soros precipitantes após a absorção dos anticorpos inespecíficos* — No quadro II apresentamos os resultados das reações quando os soros imunes

QUADRO I

Títulos das reações realizadas antes da absorção com vários antígenos

Soros \ Antígenos	*Homem*	*Porco*	*Boi*	*Cabra*	*Cão*	*Gato*	*Cavalo*	*Tatu*	*Gambá*	*Rato*	*Morcêgo*	*Lagarto*	*Galinha*	*Pombo*	*Pardal*
Anti-homem	**30.720**	5.120	2.560	2.560	2.560	5.120	5.120	5.120	—	1.280	2.560	—	—	—	—
Antiporco	2.560	**25.600**	5.120	5.120	1.280	5.120	5.120	5.120	640	640	1.280	—	—	—	—
Antiboi	640	5.120	**40.960**	40.960	320	5.120	5.120	2.560	—	—	—	—	—	—	—
Anticabra	320	1.280	10.240	**10.240**	160	320	320	1.280	640	—	—	—	—	—	—
Anticão	320	1.280	80	160	**30.720**	5.120	320	640	160	—	—	—	—	—	—
Antigato	5.120	20.480	320	5.120	40.960	**40.960**	5.120	5.120	320	—	—	—	—	—	—
Anticavalo	5.120	1.280	1.280	5.120	5.120	5.120	**25.600**	5.120	160	—	—	—	—	—	—
Antitatu	5.120	5.120	160	1.280	5.120	2.560	1.280	**20.480**	160	—	—	—	—	—	—
Antigambá	—	—	—	—	—	—	—	—	**30.720**	—	—	—	—	—	—
Anti-rato	—	320	320	320	—	1.280	2.560	2.560	1.280	**19.200**	—	—	—	—	—
Antimorcêgo	—	—	—	160	—	—	—	160	—	—	**40.960**	—	—	—	—
Antilagarto	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**19.200**	—	—	—
Antigalinha	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**30.720**	5.120	2.560
Antipombo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.560	**10.240**	2.560
Antipardal	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.120	5.120	**10.240**

O sinal (—) refere-se a reações negativas com antígenos diluídos a 1:10.

QUADRO II

Títulos das reações realizadas depois da absorção com vários antígenos

Antígenos / Soros	Homem	Porco	Boi	Cabra	Cão	Gato	Cavalo	Tatu	Gambá	Rato	Morcêgo	Lagarto	Galinha	Pombo	Pardal
Anti-homem	**20.000**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Antiporco	—	**20.000**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Antiboi	—	—	**25.600**	10.240	20	—	80	—	—	—	—	—	—	—	—
Anticabra	—	—	1.280	**3.200**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Anticão	—	—	—	—	**12.800**	80	20	—	—	—	—	—	—	—	—
Antigato	—	—	—	—	—	**15.000**	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Anticavalo	40	40	—	20	—	40	**15.000**	—	—	—	—	—	—	—	—
Antitatu	20	20	—	—	—	20	20	**10.000**	—	—	—	—	—	—	—
Antigambá	—	—	—	—	—	—	—	—	**30.000**	—	—	—	—	—	—
Anti-rato	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**12.800**	—	—	—	—	—
Antimorcêgo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**30.000**	—	—	—	—
Antilagarto	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**15.000**	—	—	—
Antigalinha	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**30.000**	5.120	2.560
Antipombo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	160	**160**	160
Antipardal	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	40	40	**160**

O sinal (—) refere-se a reações negativas com antígenos diluídos a 1:10.

foram postos a reagir com os antígenos homólogos e heterólogos depois de terem sido absorvidos.

Confrontando êstes resultados com aquêles apresentados no quadro I, verificamos que foi obtida uma melhoria geral na especificidade dos soros precipitantes em conseqüência da absorção dos anticorpos heterólogos. A análise detalhada dos números apresentados mostra que alguns dos soros imunes, embora tenham se tornado específicos para a maioria dos antígenos usados, reagiram ainda intensamente com alguns dêles. Estão entre êstes os soros antiboi e anticabra, no grupo dos mamíferos, e os soros antipombo e antipardal, no grupo das aves. O sôro antigalinha não foi absorvido com os antífenos heterólogos que com êle reagiram, isto é, soros de pombo e de pardal. Os outros soros precipitantes, se bem reajam, alguns dêles, com antígenos heterólogos, a intensidade dessas reações inespecíficas é relativamente pequena; dizemos relativamente pequena, tendo em vista os títulos homólogos apresentados pelos mesmos.

Os títulos dos soros precipitantes diminuiu acentuadamente, depois que foi feita a absorção dos anticorpos heterólogos. Os soros antipombo e antipardal, além de terem perdido quase que tôda a atividade, guardaram a inespecificidade inicial a ponto de reagirem com intensidade igual frente aos antígenos homólogos e heterólogos. O soro anticabra, já de início pouco ativo, apresentou-se com título muito baixo depois da absorção.

Repetimos a preparação de alguns soros precipitantes com características pouco adequadas para a aplicação do teste. Assim, novos soros anticabra, anticavalo e antitatu foram preparados pela mesma técnica e absorvidos, como os anteriores, fazendo exceção o sôro anticabra, ao qual deixamos de adicionar o sôro de boi. Em vista da experiência já nos ter mostrado a impraticabilidade de fazer com que os soros antiboi e anticabra pudessem ser absorvidos, com os antígenos provenientes de cabra e boi, respectivamente, evitamos a adição de sôro de boi na absorção dos anticorpos heterólogos do sôro precipitante anticabra. Assim fazendo, foi possível conseguir um sôro-imune com título 15.000. Os outros dois novos soros precipitantes, anticavalo e antitatu, apresentaram, depois de absorvidos pelos antígenos heterólogos, os títulos 30.000 e 12.800, respectivamente.

Os nossos resultados, pelo menos em alguns aspectos, diferem dos obtidos por WEITZ [16]. Assim, quando o autor faz a absorção do sôro-imune anti-homem com uma mistura dos antígenos boi, carneiro, porco, cavalo, cão e gato, verifica o desaparecimento das reações inespecíficas e a persistência da reação específica igual à que o sôro apresentava antes da absorção. Em nossa observação, em que o sôro anti-homem foi absorvido pelos antígenos porco, boi, cão, gato, cavalo, tatu e cabra, não obtivemos o mesmo resultado, pois o título específico do mesmo foi modificado em conseqüência da absorção. Em outro ponto ainda os nossos resultados são diferentes porque, ao fazer a absorção do sôro anticabra com vários antígenos heterólogos, entre êles o sôro de boi, o autor citado verifica a eliminação de tôdas as reações cruzadas, fazendo exceção apenas para o sôro de carneiro: os nossos resultados mostram que o sôro anticabra, reagindo igualmente com os antígenos boi e cabra antes da absorção, passou a reagir com menor intensidade com o antígeno boi, mas ainda com título apreciável, depois da absorção. Foi mesmo a persistência desta reação inespecífica que condicionou a aceitação de novo sôro precipitante anticabra, não absorvido com o sôro de boi, para a nossa coleção.

Em conclusão, os nossos resultados permitiram verificar que a absorção dos soros precipitantes por nós preparados provocou uma queda apreciável nos títulos homólogos dos mesmos e que, algumas vêzes, principalmente em se tratando de animais de espécies zoològicamente próximas, foi quase impossível a eliminação dos anticorpos heterólogos.

A presença em nossa coleção, de alguns soros precipitantes com pequena inespecificidade para alguns dos antígenos usados, não impede, a nosso ver, a sua utilização: pequenas diluições dos espécimes a serem examinados evitam a possibilidade de se identificar um antígeno por causa de uma reação inespecífica, se bem possamos correr o risco de, ao diluirmos o material, ultrapassarmos o título homólogo dos soros em aprêço.

Em outros casos, como por exemplo a identificação separada dos sangues de boi e cabra é impossível de ser feita com os nossos soros precipitantes. Devemos considerar ainda que, a eficiência do método será relativa, se fôr considerada a possibilidade de reações cruzadas dos nossos soros precipitantes com os soros de animais não usados na experiência.

C. *Comportamento dos soros precipitantes conservados em congelador* — Para verificar a conservação dos soros precipitantes a −18°C, escolhemos ao acaso 5 dêles para serem dosados antes e depois de 12 meses de congelamento. Neste período ocorreram algumas variações de temperatura no interior do congelador que não condicionaram o descongelamento dos soros.

Os resultados apresentados no quadro III mostram que a permanência dos soros precipitantes, por 12 meses, no estado congelado não afetou os títulos homólogos dos mesmos. As pequenas variações que aparecem são comuns nas dosagens normais em que se procura o título pela diluição do antígeno.

QUADRO III

Títulos homólogos dos soros precipitantes mantidos por 1 ano em estado congelado

Sôro precipitante	*Título anterior*	*Título posterior*
Anticão	12.000	12.800
Antigato	16.000	15.000
Antigalinha	30.000	30.000
Anticavalo	20.000	15.000
Antimorcêgo	32.000	30.000

PARTE III — APLICAÇÃO DA REAÇÃO DE PRECIPITAÇÃO A TRIATOMÍNEOS ALIMENTADOS E CONSERVADOS EM LABORATÓRIO

Segundo alguns autores, como Eligh [7] e West & Eligh [20], o uso do teste da precipitina na identificação de sangue ingerido por artrópodes sofre restrições que estão ligadas a fatôres vários: qualidade do sôro precipitante, quantidade do antígeno a ser examinado e grau de digestão do sangue a ser examinado que varia consideràvelmente conforme a espécie do inseto que o tenha ingerido e o tempo entre a ingestão e a captura. Resultados obtidos com as mais variadas espécies de artrópodes são encontrados na literatura: Gózony & col.[8]; Amaral & Aguiar [1]; Weitz & Buxton [19], etc. Dados referentes a triatomíneos, existem poucos: Romaña [13], trabalhando com ninfas de *Rhodnius prolixus*, verificou reações positivas até no 12.° dia depois do repasto sanguíneo. Com ninfas de *Triatoma infestans* nutridas em cobaia e ninfas de *R. prolixus* alimentadas em carneiro, observou resultados positivos 30 dias após a alimentação. Quanto à possibilidade da identificação separada de sangues provenientes de animais de espécies diferentes e ingeridos por um mesmo artrópode, existem também alguns dados: Gózony & col.[8], por exemplo, fazendo sugar alternadamente em cabra e em camundongo, exemplares de *Ornithodorus moubata*, verificaram reações distintas para os dois antígenos; Corrêa & Aguiar [4], examinando exemplares de *Triatoma infestans* colhidos no interior de habitações, verificaram reações positivas para sangue de galinha e de homem.

A coleta e conservação dos conteúdos intestinais a serem examinados é feita, quase sempre, da mesma maneira: os exemplares capturados são dissecados e o conteúdo intestinal colocado sôbre papel-filtro; na véspera da execução das provas, a parte manchada do papel é recortada e colocada em contato com solução fisiológica por tempo variável. Muitas vêzes, há grande conveniência em se conservarem íntegros os artrópodes colhidos em natureza. Amaral & Aguiar [1], trabalhando com mosquitos, verificaram que exemplares que foram sacrificados 12 horas após o repasto sanguíneo puderam ser conservados secos e íntegros por pelo menos um ano, permitindo depois disto a realização dos testes de precipitina.

Estudaremos êsses aspectos do problema no caso particular da aplicação da reação em triatomíneos alimentados e conservados no laboratório.

1. VERIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA REAÇÃO QUANDO APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO INTESTINAL DE "BARBEIROS" ALIMENTADOS EM UM SÓ ANIMAL

A. MATERIAL E MÉTODOS

a) *Triatomíneos usados* — Usamos ninfas de 3.° e 4.° estádios da espécie *Triatoma infestans*, criadas no laboratório e mantidas em jejum pelo menos três meses.

b) *Alimentação e pesagem dos exemplares* — Pesadas dentro de recipientes, de pêso pré-determinado, depois de alimentadas em galinhas por mais ou menos 10 minutos, foram repesadas nos seus respectivos recipientes. Assim fazendo, evitamos que a defecação espontânea dos triatomíneos, após a alimentação, contituisse causa de êrro na pesagem. As ninfas alimentadas foram distribuídas em três lotes de acôrdo com o pêso do alimento ingerido: 0 a 49 mg; 50 a 149 mg e 150 a 350 mg.

Finalmente, por sorteio, foram constituídos grupos de seis ninfas, de maneira a conter cada grupo dois elementos de cada lote.

c) *Preparação dos espécimes* — Conservados em temperatura ambiente, variando entre 16 e 29°C no período de observação, o primeiro grupo foi sacrificado 30 dias após o repasto; depois, sucessivamente, um grupo cada 15 dias, até o 10.° no 165.° dia. Os demais "barbeiros" foram sacrificados em conjunto no 180.° dia.

Os "barbeiros" foram mortos por decepação da cabeça com um corte de tesoura ao nível das inserções do primeiro par de pernas; cortávamos depois o conexivo, separávamos o revestimento dorsal do ventral e extraíamos o tubo digestivo com o seu conteúdo. Êste era triturado sôbre papel-filtro (Mn Düren 165) na superfície menor possível. Os papéis, depois de identificados com o número do triatomíneo, eram descritos com referência ao aspecto das manchas e guardados em secadores. No dia anterior à execução dos testes, as manchas eram recortadas e postas no fundo de tubos que recebiam 1,5 ml da solução fisiológica (NaCl a 0,85%). Os tubos, conservados na geladeira por uma noite, eram centrifugados por 10 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante retirado cuidadosamente com pipetas de Pasteur, era vertido sôbre o sôro precipitante no interior dos tubos de reação. As provas foram feitas pela técnica descrita na primeira parte empregando o sôro precipitante antigalinha. Com as sobras dos sobrenadantes que continham o material dos exemplares sacrificados no 180.° dia, praticamos a reação de benzidina pela técnica descrita por KOLMER [9].

B. RESULTADOS E CONCLUSÕES — Apesar de uma variação acentuada no comportamento do teste, com relação ao pêso de alimento integrido e ao tempo decorrido entre alimentação e o sacrifício, pudemos verificar que a maioria dos "barbeiros" alimentados com pouco sangue, de maneira geral os dos lotes que sugaram até 149 mg, já no 45.° dia do repasto tornaram-se inadequados à aplicação da técnica. Paradoxalmente, provàvelmente em virtude da grande variação individual, algumas reações positivas foram obtidas, com "barbeiros" alimentados com menos de 100 mg de sangue, no 165.° dia da refeição. Os exemplares que sugaram de 150 a 350 mg de sangue puderam ter o seu conteúdo identificado 120 dias depois da ingestão.

A tentativa que fizemos de selecionar os exemplares a serem examinados, pelo aspecto do material, pareceu-nos inútil em vista dos resultados que obtivemos. A única afirmação possível que resultou das nossas observações, é a de que os papéis manchados em vermelho, sinal evidente de sangue ainda conservado, condicionara sempre reações positivas. Entretanto, êste dado não poderá ser usado como critério de seleção porque são numerosos os espécimes que não apresentaram o sinal referido e que também condicionaram resultados positivos para a reação da precipitina.

A reação da benzidina, nos moldes em que foi realizada, praticada com a mesma finalidade, também não se mostrou útil para a seleção dos espécimes a serem examinados. Obtivemos resultados positivos para a reação da precipitina em "barbeiros" sacrificados no 180.° dia da refeição nos quais a reação da benzidina foi negativa.

Nas condições em que foi realizada a nossa observação, a técnica apresentou uma alta percentagem de eficiência nos "barbeiros" que se alimentaram com mais de 150 mg de sangue e que foram sacrificados 120 dias depois do repasto.

Não conhecemos dados na literatura a respeito da influência das condições ambientes na taxa de digestão de alimento ingerido por triatomíneos; alguns dados existem para outros insetos, como por exemplo os de WEST & ELIGH [20] e ELIGH [7], que mostraram uma aceleração da digestão em temperatura acima de 30°C e um retardamento a 35°C. O último autor refere também uma aceleração da digestão quando os insetos são mantidos em ambiente muito úmido a 15°C. Supondo que a digestão dos triatomíneos deva sofrer também a influência da temperatura e da umidade, parece-nos impróprio levar as conclusões do nosso experimento para os "barbeiros" capturados em natureza. Vêm reforçar a procedência dêste cuidado os achados de WEITZ & BUXTON [19], mostrando que exemplares de *Glossina morsitans*, alimentados e conservados em cativeiro, puderam ter o conteúdo estomacal identificado em 95 a 100% dos casos e que os exemplares da mesma espécie, libertados e posteriormente capturados, mostraram-se apropriados ao teste em apenas 5 a 10%, três dias após a refeição.

2. VERIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA REAÇÃO QUANDO APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO INTESTINAL DE "BARBEIROS" ALIMENTADOS EM DOIS ANIMAIS

A) MATERIAL E MÉTODOS — O material e o método empregados nesta observação foram os mesmos já referidos no primeiro item desta parte; inclui-se uma segunda refeição em cão, 18 dias depois da realizada em galinha. Grupos de cinco elementos foram constituídos por sorteio, e ao acaso, foram distribuídos para o sacrifício quinzenal. Os testes foram executados pela técnica já descrita e os soros precipitantes usados, o antigalinha e o anticão já definidos anteriormente.

B) RESULTADOS E CONCLUSÕES — A maioria dos "barbeiros" sacrificados até 75 dias do primeiro repasto puderam ter o conteúdo intestinal identificado por meio dos soros precipitantes antigalinha e anticão. Provàvelmente, em se tratando de triatomíneos de outras espécies e de outros hospedeiros sugados, a possibilidade de identificação separada seja a mesma.

3. VERIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA REAÇÃO QUANDO APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO INTESTINAL DE "BARBEIROS" QUE FORAM SACRIFICADOS NO DIA DO REPASTO SANGUÍNEO E CONSERVADOS ÍNTEGROS EM CONDIÇÕES AMBIENTES

A) MATERIAL E MÉTODOS — Os triatomíneos, depois de alimentados em galinha, foram separados em cinco lotes por ordem crescente do pêso de sangue ingerido; por sorteio, retirando um elemento de cada lote, foram constituídos seis grupos de cinco elementos. Foram sacrificados no mesmo dia da alimentação em ambiente saturado de clorofórmio e conservados, no interior de tubos abertos, em condições normais de laboratório, até o dia em que deveriam ser dissecados para a feitura das provas. A preparação do material foi feita da maneira já mencionada, desde que o conteúdo intestinal se mostrasse bastante úmido para impregnar o papel-filtro; em caso contrário, o "barbeiro" era dissecado e o seu intestino triturado diretamente no tubo com solução fisiológica.

B) RESULTADOS E CONCLUSÕES — Nas condições da nossa observação, em que os "barbeiros" sugaram um mínimo de 25 mg de sangue, êles puderam ser conservados durante pelo menos três meses, sem que isto prejudicasse o uso de nenhum dêles para a identificação do sangue sugado. Em vista dêstes resultados, é mais aconselhável que os "barbeiros" capturados em natureza sejam imediatamente sacrificados antes de serem enviados ao laboratório.

SUMMARY

Studies on the precipitin test applied to the identification of blood meals of triatomine bugs.

The precipitin test in small caliber tubes was carried out with a view on identifying the blood ingested by triatomine bugs.

Tubes 40 millimeters long and 2 millimeters internal diameter were used. By capillarity these tubes were partially filled with precipitant serum and the antigen was carefully added by means of a Pasteur pipette with a long thin end. The tubes were fixed with appropriate wood holders and the results of the test were read after two hours incubation at room temperature.

The precipitant sera were prepared inoculation rabbits intramuscularly with sera from various animals previously precipitated by potassium alumen. Before use they were absorbed with heterologous antigens, aiming to improve their specificity.

The precipitin test was applied to the intestinal contents of triatomine bugs previously fed on one animal or on animals of various species, and kept in the laboratory for various months. The test was also tried with the intestinal contents of triatomines killed soon after the feeding and maintained dry in the labratory for various months.

The following conclusions may be drawn:

The technique is simple and easy, allowing to work with small quantities of reagents and presenting satisfactory results.

Bugs that fed on one species only and having ingested from 150 to 350 mg blood gave positive tests 120 days after feeding.

Bugs that fed on two hosts of different species gave positive tests when the corresponding anti-sera were used, allowing the identification of the blood of both hosts involved.

Bugs killed and preserved dry at room temperature gave positive tests in every case up to three months after feeding.

REFERÊNCIAS

1 — AMARAL, J. P. & AGUIAR, A. A. — Reações da precipitina em alguns culicidas. Mem. Inst. Butantan 22:205-212, 1950.

2 — ARNOLD, E. H.; SIMMONS, S. W. & FAWCETT, D. G. — Precipitin technique for determining mosquito blood meals. Pub. Health Rep. 61:1244-1249, 1946.

3 — CARROLL, G. B. & KING, W. V. — The identification of blood meal of mosquitoes by means of the pricipitin test. Amer. J. Hyg. 3:491-496, 1923.

4 — CORRÊA, R. R. & AGUIAR, A. A. — O teste da precipitina na identificação da fonte alimentar do *Triatoma infestans*. (*Hemiptera Reduviidae*). Arq. Hig. Saúde pub. 17:3-7, 1952.

5 — CRUZ, F. F. — A reação das precipitinas aplicada aos dipteros do gênero *Phlebotomus*. An. Inst. Med. trop. 2:187-196, 1945.

6 — DOWNE, A. E. R. & MORRISON, P. E. — Identification of blood meals of blackflies (*Diptera Simuliidae*) attacking farm animals. Mosquito News 17:37-40, 1957.

7 — ELIGH, G. S. — Factors influencing the performance of the precipitin test in the determination of blood meals of insects. Can. J. Zool. 30:213-218, 1952.

8 — GÓZONY, L.; HINDLE, E. & ROSS, P. H. — Serological tests. J. Hyg. 14:354-359, 1914.

9 — KOLMER, J. A. — Clinical diagnosis by laboratory examinations. 2nd edition. New York, Appleton, 1949.

10 — MAC FARLANE, A. S. — Behavior of lipoids in human serum. Nature, London 149:439, 1942.

11 — PROOM, H. — The preparation of precipitating sera for the identification of animal species. J. Path. Bact. 55:419-426, 1943.

12 — RICE, J. B. & BARBER, M. A. — Malaria studies in Greece. A modification of the Uhlenhuth-Weidanz precipitin test for determining the source of blood meals in mosquitoes and other insects. J. Lab. & clin. Med. 20:876-883, 1934.

13 — ROMAÑA, C. — Utilisation de la méthode des precipitines pour l'identification du sang ingeré par certain reduvidés. Bull. Soc. Path. exot. 32:625-628, 1939.

14 — SCHUBERT, J. H. & HOLDEMAN, L. V. — A modified precipitin technique for determining the source of mosquito bloodmeals. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 5:272-273, 1956.

15 — SCHUBERT, J. H. & KELLEY, M. H. — The precipitin technique for determining species of host blood in mosquitoes: modifications and improvements. J. Nat. Mal. Soc. 9:341, 1950.

16 — WEITZ, B. — The antigenicity of sera of man and animals in relation to the preparation of specific precipitating antisera. J. Hyg., London, 50:275-294, 1952.

17 — WEITZ, B. — An automatic dispenser for multiple serological titrations. J. Path. Bact. 55:419-426, 1957.

18 — WEITZ, B. — Identification of blood meals of blood-sucking arthropods. Bull. W.H.O. **15**:473-490, 1956.

19 — WEITZ, B. & BUXTON, P. A. — The rate of digestion of blood meals of various haematophagous arthropods as determined by the precipitin test. Bull. ent. Res. **44**: 445, 1953.

20 — WEST, A. S. & ELIGH, G. S. — The rate of digestion of blood in mosquitoes precipitin test studies. Can. J. Zool. **30**:267, 1952.

21 — WOLFE, H. R. — The effect of injection methods of specificity of serum precipitins. J. Immun. **29**:1-12, 1935.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(1):54-58, janeiro-fevereiro 1960.

Registro de Casos

VERIFICAÇÃO DE *FLAVOBACTERIUM MENINGOSEPTICUM* KING, 1959, EM SÃO PAULO (BRASIL)

Carlos SOLÉ-VERNIN [1], Cecília Mattos ULSON [2] e Milton ZUCCOLOTTO [3]

RESUMO

Flavobacterium meningosepticum King, 1959, nova espécie associada a meningites infantis, esporádicas ou de surtos epidêmicos, foi verificada em São Paulo, como agente etiológico de meningite em recém-nascido prematuro. O diagnóstico bacteriológico é minuciosamente discutido.

INTRODUÇÃO

Numa comunicação feita à Secção de Pediatria da Associação Paulista de Medicina, ZUCCOLOTTO & SOLÉ-VERNIN [4] tiveram a oportunidade de discutir aspectos sobretudo clínicos de um caso de meningite com hidrocefalia, em recém-nascido prematuro, produzida pelo *Flavobacterium meningosepticum*, nome proposto por KING [3] para um novo agente etiológico e que, naquela ocasião, era identificado pela primeira vez em São Paulo. Nos Estados Unidos as infecções apresentavam dois aspectos epidemiológicos (BRODY, MOORE & KING [1]): infecções esporádicas e surtos epidêmicos.

Como se trata de uma espécie bacteriana patogênica de reconhecimento muito recente, resolvemos, nesta nota, depois do resumo clínico do caso, expor alguns pormenores atinentes ao diagnóstico bacteriológico, sobretudo no que diz respeito às características fundamentais da nova espécie e ao seu diagnóstico diferencial frente a outras com as quais poderia apresentar alguma semelhança.

Dept. Microbiol. e Imunol. da Fac. Med. U.S.P. (Prof. C. S. Lacaz) e da Clín. Pediátrica do Hosp. das Clínicas (Prof. P. de Alcântara).

(1) Assistente e Chefe da Secção de Bacteriologia.

(2) Biologista.

(3) Médico Auxiliar da Clín. Pediátrica.

RESUMO CLÍNICO

Identificação — Recém-nascido, feminino, branco, reg. nº 32.164, internado no Berçário da Clínica Pediátrica do Hospital das Clínicas (Serviço do Prof. P. de Alcântara).

História pregressa — Segundo filho de mãe com 23 anos. Durante o trabalho de parto, as condições maternas eram boas e as condições fetais regulares. Idade fetal de 28 semanas. Parto normal, a 29-3-1959. Apresentação cefálica, chorou no primeiro minuto após o nascimento. Não houve manobras de ressuscitação.

Exame físico inicial — 30-3-1959. Estado geral regular. Gemente. Moro presente. Preensão presente. Sucção esboçada. Cianose das extremidades. Estatura: 45,5 cm; pêso: 1.610 g; perímetro cefálico: 34 cm; biparietal: 7,5 cm; occípito-frontal: 10,5 cm; perímetro torácico: 28 cm; perímetro abdominal: 30 cm.

Evolução — Nos dias subseqüentes a criança continuou gemente, prostrada. Apresen-

tou icterícia, períodos de recusa de alimento, crises de apnéia, hipertonia e temperatura.

Em 10-4-59, foi feito exame de líquor, no Hospital das Clínicas, com o seguinte resultado:

Punção — SOD
Condições — chôro
Aspecto — turvo-xantocrômico

Citologia:
Hemácias — 0
Leucócitos — 900

Linfócitos — 30%
Monócitos — 10%
Neutrófilos — 60%

Glicose — 12 mg%
Pandy — ++

Sedimento — Mucopurulento. Flora bacteriana abundante, representada por bacilos e coco-bacilos Gram-negativos, com morfologia de *Haemophilus*.

O prematuro recebeu Cloranfenicol, Novobiocina, Sulfadiazina e Iloticina. Os exames de líquor continuaram com o mesmo aspecto turvo-xantocrômico, grande aumento de células, com predomínio de neutrófilos, açúcar e cloretos baixos e proteínas altas. Em 19-5-59 o perímetro cefálico passou a 35 cm e a 25-5-59 alcançou 36,5 cm.

Medicada com Novobiocina oral e Eritromicina intramuscular, de acôrdo com o antibiograma, persistiram as alterações liquóricas, continuando o aumento do perímetro cefálico da criança que atingiu 40 cm a 30-6-59. Nessa ocasião, tendo em conta um exame de transiluminação realizado, suspeitou-se de anencefalia. Um eletrencefalograma feito evidenciou atividade elétrica ao nível de todos os eletrodos utilizados. Em 17-7-59 a cultura do líquor resultou negativa. A criança obteve alta, a 28-8-59, da Clínica de Moléstias Tropicais e Infectuosas, para onde fôra transferida, tendo 5 meses, pesando 2.970 g, o perímetro cefálico medindo 44 cm, e apresentando quadro clínico de rigidez descerebrada.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

O líquor apresentava-se muito turvo. O exame microscópico do sedimento do líquor, corado pelo método de Gram, revelou pió-citos polimorfonucleares e freqüentes bastonetes finos Gram-negativos, alguns fagocitados. O aspecto era altamente sugestivo de *Haemophilus*, e, esperando encontrar talvez o *Haemophilus influenzae*, foi feita cultura em ágar-infusão de coração com sangue de coelho a 20%. O aspecto da lâmina de sedimento do líquor corado pelo Gram correspondia a aspectos habituais, de modo que não ocorreu, naquele momento, a importância que poderia ter a sua conservação como documento bacteriológico.

A incubação da placa deu colônias pequenas, não β-hemolíticas, em cultura pura, de um germe que ainda poderia ser o *Haemophilus influenzae*, mas, um cultivo que simultâneamente tinha sido feito em caldo simples, deu, também, excelente crescimento. Afastada a hipótese de *Haemophilus* inclusive de *Bordetella pertussis*, que também exige hemina e coenzima ao isolamento, na fase I, pensou-se em alguma enterobactéria. Foi então feita a série de testes bioquímicos que habitualmente se emprega para êsse grupo, e observou-se que, apesar do meio básico ser suficiente para promover o crescimento do germe em questão, não houve a produção de ácido em nenhum dos "açúcares" empregados, após 24 horas de incubação, mesmo na dextrose. Afastou-se, por isso, a hipótese de *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, etc. Poderia tratar-se de *Alcaligenes*, *Pseudomonas* ou, então, de algum membro daquele grupo mal estudado de Gram-negativos que inclui os gêneros *Herrellea*, *Mima* e *Colloides;* mas, entre outras diferenças, tal como *Salmonella* (na imensa maioria dos casos), êstes germes são indol-negativos, ao passo que o germe em identificação era indol-positivo.

Em resumo, segundo KING [3], *Flavobacterium meningosepticum* é bastonete fino, Gram-negativo, imóvel, nitrato negativo, indol positivo (caráter importante e crítico), proteolítico e produz ácido, tardiamente, a partir de alguns carboidratos, por processo oxidativo. No quadro I podem verificar-se alguns subsídios para o diagnóstico diferencial.

BRODY, MOORE & KING [1] consignam que o germe era lento *fermentador* de alguns carboidratos, necessitando de 1 a 3 semanas para formação de ácido. Como a fermentação é um processo metabólico anaeró-

QUADRO I

Subsídios para o diagnóstico diferencial, por meio de alguns caracteres genéricos, entre *Flavobacterium meningosepticum* e outras espécies bacterianas

Gêneros	*Caracteres diferenciais*
Salmonella, Shigella, Escherichia, etc.	Glicose fermentada em 24 horas
Haemophilus	Exige sempre fatôres X e V Nitrato positivo (*influenzae,* etc.) Indol negativo (várias espécies) Gelatina negativa (várias espécies)
Bordetella	Exige fatôres X e V ao isolamento (morfologia cocóide) Não proteolítico Indol negativo Não ataca açúcares Citrato e uréia positivos (*parapertussis*) Móvel (*bronchiseptica*)
Brucella	Glicose fermentada e uréia positiva
Alcaligenes	Pigmento negativo Indol e gelatina negativos
Pseudomonas	Pigmento positivo (azul-esverdeado) Indol e gelatina negativos
(*Tribo Mimae*) *Herrellea, Mima* e *Colloides*	Indol negativo (*Mima,* cocóide)

bico, em nossas primeiras experiências os tubos de cultura foram tamponados à parafina com o objetivo de apressar o possível ataque a êsses substratos (os empregados foram: dextrose, lactose, sacarose, manita, maltose e xilose). Apesar dêsse artifício de técnica, mesmo ao fim de 3 semanas de incubação (limite máximo em que alguns resultados deviam positivar-se), os testes continuavam negativos e assim permaneciam até a 5ª semana de incubação. Salvo essa aparente exceção (logo esclarecida, como adiante será exposto), o protocolo das características morfológicas, tintoriais e fisiológicas da bactéria isolada ficava consistente com a hipótese de tratar-se da nova espécie.

Em resumo: bastonete mais ou menos longo (6 a 12 micra, em média), fino, Gram-negativo, imóvel; cresce bem nos meios comuns básicos de cultura, aeróbio, catalase intensamente positiva; em 24 horas, dá colônias pequeníssimas em Mac Conkey e Teague, mas não cresce em SS (Difco); cresce bem no meio de Surraco-Violeta, sem alterá-lo; não fermenta os "açúcares" comumente empregados no diagnóstico de enterobactérias; VM e VP, ambos negativos; crescimento em meio de citrato (Simmons), duvidoso a negativo; nitrato negativo; indol positivo fraco; urease negativo; H_2S negativo em ágar-acetato, mas positivo fraco na tira de papel impregnado de acetato; intensamente proteolítico (gelatina e leite); pigmentação amarelada com o prolongamento da incubação, bem visível no leite, que é peptonizado; hemólise esverdeada em ágar-infusão-sangue de coelho, quase adstrita ao local ocupado pela colônia.

O antibiograma do germe aqui isolado também corresponde, em linhas gerais, ao achado por King: o germe é muito resistente aos antibióticos; resistente à penicilina, cloromicetina, tetraciclina, terramicina, aureomicina, nitrofurazone e kanamicina; sensível à iloticina e novobiocina.

KING [3] fêz estudo minucioso da fisiologia da nova espécie; apresentou relatório preliminar de sua classificação antigênica em, pelo menos, três diferentes tipos sorológicos; e, finalmente, propôs-lhe o nome de *Flavobacterium meningosepticum*. As observações sôbre a fisiologia do microrganismo vieram revelar um fato de importância decisiva, a saber, o metabolismo oxidativo (e não, fermentativo) na utilização dos carboidratos: a expressão *processo oxidativo* substitui neste segundo trabalho, a de *fermentação*, que aparecia no primeiro. Por conseguinte, o tamponamento dos tubos de cultura com parafina, como havíamos feito inicialmente, estava contra-indicado, e, nessas condições, é certo que os carboidratos seriam atacados com maior dificuldade, mesmo porque o meio de cultura empregado ainda era semi-sólido; de fato, como já consignamos, mesmo ao fim de 5 semanas, não verificamos o menor grau de acidez. Por isso recorremos a uma nova técnica, agora para comprovar o processo oxidativo, empregando a dextrose (que seria positiva) e a sacarose (que seria negativa) nas concentrações de 1 e 5%. O resultado começou a positivar-se às 48 horas de incubação, sendo francamente positivo às 72 horas. A técnica empregada foi a HUGH & LEIFSON [2], modificada, pelo fato de termos inclinado os tubos para manter grande superfície líquida em contato com o ar contido nos tubos. Ficou, dêsse modo, esclarecida a aparente exceção nas características do germe aqui encontrado, com relação ao descrito por BRODY, MOORE & KING [3].

O germe foi isolado em São Paulo, por duas vêzes, da mesma paciente: a primeira a 29 de maio e a segunda, a 3 de julho de 1959. A 17-7-59 uma nova tentativa de isolamento foi negativa.

Enviamos uma amostra dêsse germe a Miss King (C.D.C., Chamblee, Georgia) para que tivesse a gentileza de verificar o nosso diagnóstico e, sobretudo, para classificação antigênica. Obtivemos a confirmação do diagnóstico e a informação de que a amostra brasileira não pertence a nenhum dos três tipos sorológicos americanos, havendo, entretanto, aglutinação lenta nos três soros específicos, interpretada como do tipo "O".

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Fêz-se uma investigação de anticorpos específicos no sôro da paciente (colhido a 2 de julho), na forma que a seguir se resume. Adotaram-se dois tipos de aglutinação: em lâmina (sôro não diluído) e em tubos.

A aglutinação em lâmina, com sôro inativado da paciente, deu 4 cruzes de positividade (aglutinação rápida, grumos grandes); com sôro não inativado, apenas 2 cruzes. O sôro inativado da mãe da paciente deu 1 cruz; seis outros soros inativados, de pessoas aparentemente normais, deram: 2, negativos; 3, 1 cruz e 1, duvidoso.

Com sôro inativado e não inativado da paciente, foram também feitos testes de aglutinação em tubos, sendo as diluições finais sempre dobradas, de 1/10 até 1/2.560. Quanto aos tipos de incubação, foram feitos dois, um a 48°C (banho-maria), durante 24 horas; e outro, a 37°C (estufa) por 2 horas e a seguir a 4°C (geladeira), até o dia seguinte. Quanto aos tipos de antígenos, também dois foram usados: um, suspensão viva do germe de cultura recente em ágar-infusão-sangue, e outro, a mesma suspensão referida, morta pelo banho-maria fervente durante 10 minutos.

Dessas oito combinações, só duas deram resultado positivo: aquelas em que o antígeno era vivo e a incubação a 48°C, quer com sôro inativado, quer sem inativar. Os tubos contrôles apresentaram-se em boas condições. Verificou-se aglutinação macroscópica, confirmada ao microscópio, até a diluição final de 1/320. Na série do sôro não inativado, observou-se lise quase completa no 1º tubo. Os resultados positivos dos testes de aglutinação foram interpretados como devendo-se a aglutinação do tipo "K" e não do tipo "O".

SUMMARY

Verification of "Flavobacterium meningosepticum" King, 1959, in São Paulo, Brazil.

Flavobacterium meningosepticum King, 1959, new species associated with sporadic or epidemic meningitis in infants, was found in São Paulo (Brazil), as the etiologic agent

of a premature newborn meningitis. The bacteriologic diagnosis is fully discussed.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam expressar o seu muito penhorado agradecimento a Miss Elizabeth O. King (C.D.C., Chamblee, Georgia) pela gentileza que teve, na confirmação do diagnóstico bacteriológico.

REFERÊNCIAS

1 — BRODY, J. A.; MOORE, H. & KING, E. O. — Meningitis caused by an unclassified Gram-negative bacterium in newborn infants. A.M. A.J. Dis. Child. **96**:1-5, 1958.

2 — HUGH, R. & LEIFSON, E. — The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bact. **66**:24-26, 1953.

3 — KING, E. O. — Studies on a group of previously unclassified bacteria associated with meningitis in infants. Am. J. clin. Path. **31**: 241-247, 1959.

4 — ZUCCOLOTTO, M. & SOLÉ-VERNIN, C. — Sôbre um caso de meningite em prematuro por germe recentemente classificado. Trabalho apresentado à Secção de Pediatria da Associação Paulista de Medicina, em 31 de agôsto de 1959.

Recebido para publicação em 20 outubro 1959.

Livros Recebidos

LISTERIOSE — Dr. H. P. R. Seeliger. Leipzig, Johann Ambrosius Barth, Verlag, 1958, 193 páginas e 63 ilustrações (58 em prêto e branco e 5 a côres).

A crescente importância que dia a dia vem se conferindo à *Listeria monocytogenes* em patologia humana e animal, faz com que recebamos com real satisfação a nova edição de "Listeriose".

A obra está dividida em quatro grandes capítulos. No primeiro, de interêsse fundamental para o bacteriologista, o autor estuda com detalhes a sistemática, os caracteres culturais, a identificação sorológica, a fagotipagem e a patogenicidade da *Listeria monocytogenes* para o animal de laboratório. No segundo, estuda a listeriose em animais, amplas informações sendo fornecidas sôbre os diversos aspectos do problema. O terceiro capítulo, também o mais extenso dos quatro, é dedicado à incidência, clínica, anatomia patológica, terapêutica e profilaxia da listeriose humana. As diferentes formas clínicas são discutidas e numerosos casos ilustrativos apresentados. A anatomia patológica é ricamente documentada. Merecem tôda e especial atenção do médico as discussões sôbre a *Listeria monocytogenes* como causa de abortos e de processos inflamatórios do sistema nervoso central. O quarto capítulo versa sôbre o diagnóstico de laboratório da listeriose. Encontram-se, aqui, informações minuciosas desde a colheita do material às diversas provas sorológicas passíveis de uso.

A impressão e as ilustrações do livro são excelentes e a revisão bibliográfica é pràticamente completa. São citados 537 trabalhos.

"Listeriose" foi escrito com método, clareza e profundidade. Cada capítulo representa a experiência amadurecida e a autoridade incontestável do autor.

L. R. Trabulsi

Noticiário

PRÊMIO "SILVA LIMA" DE MEDICINA TROPICAL

Comemora-se a 10 de fevereiro do corrente ano o cinqüentenário da morte de José Francisco da Silva Lima, uma das mais destacadas figuras da medicina brasileira, na segunda metade do século XIX, e que, juntamente com Wucherer e Paterson, formava o cerne da escola tropicalista baiana.

Como homenagem a essa figura pioneira de médico e de pesquisador consagrado nos domínios da nossa patologia, a Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo decidiu instituir um prêmio, a ser distribuído entre os jovens pesquisadores de hoje, com caráter de estímulo à iniciação científica.

O Prêmio "Silva Lima" de Medicina Tropical, no valor de Cr$ 25.000,00, será conferido ao melhor trabalho de investigação, inédito ou publicado no ano de 1960, por estudantes ou médicos com menos de 5 anos de formado, das escolas médicas do País. O trabalho deve versar sôbre tema de medicina tropical.

O julgamento estará a cargo de uma comissão de especialistas formada por membros da Comissão de Redação da Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

O prazo para entrega dos trabalhos à Secretaria da Revista encerra-se a 10 de janeiro de 1961.

UNIÃO DAS UNIVERSIDADES DA AMÉRICA LATINA

O Instituto de Medicina Tropical de São Paulo acaba de receber elevada distinção da União das Universidades da América Latina, com sede na Cidade do México, credenciando-o como centro de treinamento científico e docente no campo da medicina tropical. Desta maneira, bolsistas latino-americanos qualificados, receberão no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo ensinamentos necessários à especialização no campo da medicina tropical.

ASSOCIAÇÃO LATINO-AMERICANA DE PROCTOLOGIA

A Associação Latino-Americana de Proctologia, fará realizar em São Paulo, de 13 a 17 de setembro do corrente ano, o I Congresso Latino-Americano e o II Congresso Internacional que terão lugar, simultâneamente, com o X Congresso Brasileiro de Proctologia.

Foram escolhidos para Temas Oficiais dos Congressos, os seguintes:

1) Megacólon Adquirido e Congênito

1) Câncer dos Cólons

3) Retocolite Ulcerativa

4) Ilestomias e Colostomias

os quais serão discutidos sob forma de Simpósio e Mesa Redonda. Haverá também um Colóquio sôbre Moléstia Hemorroidal.

Paralelamente às sessões científicas serão realizados cursos de Patologia Especializada, assim como exposição radiológica e exibição de filmes científicos.

A Secretaria do Congresso está instalada à Rua Xavier de Toledo, 140, 3.º andar, s/5 — São Paulo.